

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

TONINO ANTONETTI

ASPECTS NEUROCHIMIQUES DE LA MODULATION DE L'ACTIVITÉ
DES RÉCEPTEURS NMDA PAR LES LIGANDS SIGMA
DANS LE CERVEAU DE RAT

AVRIL 1996

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

À ma mère et à mon père,

pour leur support et leur encouragement.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance à mes co-directeurs de maîtrise, les docteurs Richard Brière et Guy Massicotte. Je tiens à remercier le Dr Guy Massicotte, Ph.D., professeur au Département de Chimie-Biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières, de m'avoir initié à la recherche scientifique. Par ses remarques et ses directives stimulantes, il m'a apporté une dimension intéressante et il a su m'encourager par le dynamisme qu'il a pour la recherche.

Je remercie également Dr Richard Brière, Ph.D., professeur adjoint au Département de Psychiatrie de l'Université de Montréal, co-directeur du projet de recherche, dont les conseils judicieux ont profondément orienté la conduite de mes travaux. Il m'a permis de développer les attitudes et les comportements nécessaires à l'élaboration d'un travail de recherche scientifique. De plus, sa compétence et son dévouement m'ont assuré un appui important afin de mener à bien cette tâche. Puisse ce travail qu'il a conçu être le témoignage de ma gratitude.

Je remercie également ma copine Lidia qui m'a aidé dans la traduction de certains manuscrits. Elle a aussi manifesté une confiance illimitée par sa compréhension et, par son encouragement, elle a su me seconder merveilleusement.

Un gros merci à mon frère Massimiliano pour la qualité exceptionnelle des figures. Merci également au Dr Karen Dewar, au Dr Richard Warren et à Patricia Bonnot pour le temps qu'ils ont consacré à m'aider dans différentes situations.

Je suis reconnaissant envers le Fonds de la Recherche de Santé du Québec, réseau Santé Mentale, pour le support financier qu'il m'a apporté.

Enfin il est important pour moi de souligner les amitiés que j'ai créées avec les étudiants et le personnel du Centre de Recherche Fernand Seguin.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
SOMMAIRE.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : CARACTÉRISTIQUES DES INTERACTIONS	
LIGANDS/RÉCEPTEURS	5
1.1 La notion de récepteur	6
1.1.1 Courbe de saturation.....	10
1.1.2 Courbe de compétition	14
1.3 Courbe de dissociation.....	15
1.2 Caractéristiques pharmacologiques des récepteurs	
glutamatergiques.....	16
1.2.1 Les récepteurs métabotropes pour le glutamate	17
1.2.2 Les récepteurs ionotropes pour le glutamate	18
1.2.2.1 Les récepteurs non NMDA.....	19
1.2.2.2 Propriétés des récepteurs NMDA	22
1.3 Propriétés des sites sigma	28
1.3.1 L'existence de deux sites sigma	31
1.4 Les protéines G.....	32
1.4.1 Les toxines inhibant les protéines G	34
1.5 Interaction <i>in vivo</i> d'un ligand sigma	35
1.6 Hypothèse et objectif du projet de recherche.....	36

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	39
2.1 Matériels	39
2.2 Préparation des synaptosomes.....	39
2.2.1 Traitement pharmacologique des synaptosomes.....	43
2.2.2 Études de radiolisation sur les synaptosomes	45
2.2.3 L'introduction de molécules non diffusibles dans les synaptosomes.....	47
2.3 Dosage des protéines	49
 CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	 50
3.1 Effet des ligands sigma sur la modulation du récepteur NMDA.....	51
3.1.1 Effet de la toxine pertussique	60
 CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	 63
4.1 L'existence de deux états d'activation du récepteur NMDA.....	63
4.2 L'interaction entre le site sigma et le récepteur NMDA.....	66
4.3 Effet de la toxine pertussique.....	69
4.4 Mécanismes de transduction des sites sigma.....	71
4.5 L'hypothèse de la schizophrénie.....	74
4.6 Perspectives.....	78
 CONCLUSION	 81
RÉFÉRENCES.....	83
APPENDICE A	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Glossaire des termes biochimiques et pharmacologiques concernant l'étude des récepteurs.....	11
Tableau 2. Effet de la toxine pertussique sur les paramètres de liaison du [³ H]MK-801.....	61

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Vue moléculaire des quatre types de récepteurs glutamatergiques.	21
Figure 2. Représentation schématique de la structure du récepteur de type NMDA pour le neurotransmetteur glutamate.....	24
Figure 3. Représentation schématique de l'hypothèse postulée de la modulation du récepteur NMDA par les sites sigma.	38
Figure 4. Déroulement temporel des traitements pharmacologiques.....	44
Figure 5. Courbe de saturation de la liaison du [³ H]MK-801.....	55
Figure 6. Analyse de Scatchard de la liaison du [³ H]MK-801.	56
Figure 7. Déplacement dose dépendante de la radioliasion du [³ H]MK-801.....	57
Figure 8. Constante de dissociation du [³ H]MK-801 en présence de DTG.	58
Figure 9. Constante de dissociation du [³ H]MK-801 en présence de DTG et de certains antagonistes dopaminergiques.....	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromole par litre
(+)NAMN	N-allylnormétazocine ou SKF-10047
3-PPP	(+)-3-(hydroxyphényl)- <i>N</i> -(1-propyl)pipéridine
5-HT	5-hydroxytryptamine sérotonine
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole-4-propionique
AMP _c	adénosine monophosphate cyclique
AP4	2-amino-4-phosphonobutyrique
AP5	amino-4-phosphopentanoate
AP7	2-amino-4-phosphoheptanoate
ATP	adénosine triphosphate
ATP- γ -S	adénosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)
BAPTA	acide 1,2,-bis(o-aminophenoxy)éthane-tétraacétique
B _{eq}	site de liaison à l'équilibre

B_i	site de liaison initiale
B_{\max}	densité maximale des sites de liaison
Ca^{2+}	ion calcium
CCP	acide carboxypropylphosphonique
C_i	Curie
Cl^-	ion chlore
DAG	diacyglycérol
DTG	1,3-di(2-tolyl)-guanidine
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diaminotétraacétique
EGTA	acide éthylène glycoltétraacétique
g	gramme
g	accélération de la pesanteur ($9,81 \text{ m/s}^2$)
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GDP	guanosine diphosphate
GMP	guanosine monophosphate
Gpp(NH)p	5'-guanilylimidodiphosphate
GTP	guanosine triphosphate
h	heure
IC_{50}	concentration qui inhibe 50% de la liaison spécifique
IgG	immunoglobuline G

IP ₃	inositol 1,4,5-trisphosphate
i.v.	intraveineux
K ⁺	ion potassium
k ₊₁	constante cinétique d'association
k ₋₁	constante cinétique de dissociation
KA	kaïnite
K _D	constante de dissociation à l'équilibre
K _i	constante d'inhibition
L [*]	concentration de radioligand totale
ln	logarithme népérien
LTP	potentialisation à long terme
M	mole par litre
mg	milligramme
Mg ²⁺	ion magnésium
min	minute
MK-801	dizocilpine
ml	millilitre
mmol	millimole
mM	millimole par litre
MNQX	5,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione
Na ⁺	ion sodium

NEM	<i>N</i> -éthylamaléide
nm	nanomètre
nM	nanomole par litre
nmol	nanomole
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
P	probabilité statistique
PCP	phencyclidine ou 1-[1-phenylcyclohexyl]piperidine
PDE	phosphodiesterase
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLC	phospholipase C
pmol	picomole
SNC	système nerveux central
SKF-10047	N-allylnormétazocine ou (+)NAMN
r	coefficient de régression linéaire
t	temps
t _½	temps de demi-dissociation
TCP	N-[1-(2-thiényl)cyclohexyl]-pipéridine
Zn ²⁺	ion zinc

SOMMAIRE

La phencyclidine (PCP), connue sur le marché noir sous le nom d'«angel dust», entraîne des effets psychotomimétiques qui ressemblent aux symptômes de la schizophrénie. À cet égard, en étudiant les sites d'action de la phencyclidine dans le système nerveux central (SNC) on espère découvrir à l'échelle cellulaire les bases biologiques des comportements psychotiques, pour favoriser le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. La phencyclidine se lie à deux sites distincts dans le cerveau. Un de ces sites appartient à la famille des récepteurs pour le neuromédiateur glutamate. Il s'agit plus précisément d'un sous-type de récepteur qui réagit sélectivement au *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA), un analogue pharmacologique du glutamate. Ce sous-type de récepteur, auquel on donne le nom de récepteur NMDA, forme un complexe récepteur-canal ionique qui participe à plusieurs processus physiologiques. Le récepteur NMDA participe entre autres à la synaptogenèse, à l'excitotoxicité, ainsi qu'à la potentialisation à long terme (LTP), laquelle est un substrat biologique de la mémoire et fait partie des processus généraux

de la plasticité neuronale. L'autre site d'action de la phencyclidine dans le cerveau est le site sigma, auquel se lient certains neuroleptiques et agents psychotropes. Le ligand endogène pour le site sigma reste toujours à être identifié.

Des données récentes en électrophysiologie et en pharmacologie suggèrent que l'activation des sites sigma peut moduler les réponses glutamatergiques assurées par les récepteurs de type NMDA. Nous postulons dans la présente étude que les sites sigma peuvent modifier les caractéristiques biochimiques des récepteurs NMDA. Pour examiner les mécanismes biochimiques potentiellement mis en jeu lors de cette modulation de la réponse NMDA, nous avons étudié, en présence de ligands sigma, la liaison de la dizocilpine (MK-801) au site de la phencyclidine du canal ionique associé au complexe récepteur NMDA.

Nous avons conduit des expériences sur des préparations synaptosomales de cortex cérébral de rat traitées avec le 1,3-di(2-tolyl)-guanidine (DTG), un agoniste spécifique des sites sigma. Les préparations synaptosomales constituent un modèle du neurone qui permet d'étudier les seconds messagers et aussi d'investiguer les régulations intracellulaires. Nous avons mesuré les paramètres de la radioliasion du [^3H]MK-801 qui sont un

indice de l'état d'activation du récepteur NMDA. Dans des conditions témoins, le [^3H]MK-801 se lie avec une grande affinité et une haute spécificité au site PCP des récepteurs NMDA. Quand nous ajoutons le DTG (10 nM) aux préparations synaptosomales, l'affinité du [^3H]MK-801 augmente sans changement du nombre de sites mesurés. Pour bien montrer que cet effet découle de l'activation des sites sigma, nous avons utilisé l'halopéridol (1 μM), un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D_2 qui a aussi une forte affinité pour les sites sigma, pour abolir la modulation de l'affinité du [^3H]MK-801. En revanche, le sulpiride (1 μM), un autre antagoniste des récepteurs dopaminergiques D_2 qui n'a cependant aucune affinité pour les sites sigma, n'inhibe pas l'effet du DTG sur la K_D du [^3H]MK-801. Ces résultats suggèrent que l'activation des sites sigma augmente l'affinité du [^3H]MK-801 pour le site PCP des récepteurs NMDA.

Il a été démontré que les sites sigma agissent via une interaction avec un système de protéine G. Pour évaluer cette possibilité nous avons examiné comment la modulation du récepteur NMDA par le DTG est affectée par la toxine pertussique. La toxine pertussique inactive certains types de protéines G. En présence de toxine pertussique (100 nM), on remarque une perte totale de la modulation de l'affinité de la liaison du [^3H]MK-801 au récepteur NMDA après traitement des synaptosomes avec le DTG (100

nM). Ces résultats permettent donc d'affirmer l'existence d'une protéine G. L'élucidation des mécanismes cellulaires responsables de cette modulation glutamatergique par les sites sigma présente un intérêt certain pour comprendre les mécanismes d'action des agents psychotropes, et d'une manière plus générale, l'étiologie de la schizophrénie.

INTRODUCTION

La phencyclidine (1-[1-phenylcyclohexyl]piperidine ou PCP, «angel dust») synthétisée en 1956 a été utilisée en clinique à la fin des années cinquante comme anesthésique puissant et d'action rapide. Son usage médical a toutefois été de courte durée, car il s'est avéré que la phencyclidine avait des effets psychotomimétiques et on a cessé de l'utiliser en clinique en 1965 (Sonders *et coll.*, 1988). Une dose unique peut entraîner chez un sujet normal des symptômes cliniques difficiles à distinguer de la schizophrénie de type paranoïde. Cette drogue est donc considérée comme l'un des meilleurs modèles pharmacologiques de la schizophrénie (Snyder, 1980). Les effets psychotomimétiques se définissent comme étant une affection mentale caractérisée par une désintégration généralement profonde de la personnalité, avec troubles de la perception, du jugement, du raisonnement et du comportement, dont la personne n'a pas conscience.

La schizophrénie est une affection mentale endogène de cause inconnue, caractérisée essentiellement : par la dissociation de la personnalité (incohérence idéo-verbale, idées délirantes mal systématisées) ; par l'impression d'être sous l'influence de forces étrangères ; par de profondes perturbations affectives dans le sens du détachement et de l'étrangeté des sentiments, du repliement sur soi-même et d'une perte de contact avec la réalité ; sans atteinte, en général, de la lucidité, ni détérioration irréversible des facultés intellectuelles. En fait, le concept de schizophrénie englobe un groupe de psychoses à évolution chronique et sa signification est différente selon les pays et selon les points de vue des grands psychiatres qui font école.

La phencyclidine interagit avec plusieurs sites de liaison, récepteurs canaux ioniques. Dans le cerveau des mammifères, deux sites de liaison distincts ont une haute affinité pour la phencyclidine : l'un est le récepteur NMDA sur lequel elle agit comme antagoniste non compétitif ; l'autre est le site sigma (Quirion *et coll.*, 1987 ; 1992). Ces deux sites présentent des ressemblances marquées mais ont un profil pharmacologique clairement distinct. On pense que les sites sigma peuvent être impliqués dans des maladies psychiatriques, comme la schizophrénie. L'élucidation du mode d'action de la phencyclidine et des sites sigma présentent donc un intérêt

certain pour comprendre l'étiologie de la schizophrénie mais aussi d'une manière plus générale pour comprendre les mécanismes d'action des neuroleptiques. Durant ce projet de recherche, nous nous sommes intéressés à la modulation du site de liaison du PCP sur le récepteur glutamatergique de type NMDA.

Plusieurs travaux suggèrent une interaction entre les sites sigma et les récepteurs NMDA (Monnet *et coll.*, 1990, 1992 ; Rao *et coll.*, 1991 ; Debonnel *et coll.*, 1990 ; Yamamoto *et coll.*, 1995). Ainsi, des données électrophysiologiques récentes (Monnet *et coll.*, 1990, 1992 ; Debonnel *et coll.*, 1990) montrent une augmentation de la réponse synaptique assurée par les récepteurs glutamatergiques de type NMDA dans les cellules de l'hippocampe après l'administration de ligands des sites sigma. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous évaluons biochimiquement *in vitro* l'interaction entre l'activation des sites sigma et les changements des propriétés de liaison des récepteurs NMDA mis en évidence par Monnet *et coll.* (1990, 1992) et Debonnel *et coll.* (1990). Les études ont été effectuées sur des préparations de synaptosomes, lesquelles permettent de conserver les mécanismes cellulaires pouvant participer dans la modulation de la réponse NMDA.

Dans le chapitre qui suit, nous présenterons plus clairement certaines notions qui vous permettront de vous familiariser avec le domaine de recherche discuté dans ce mémoire. Les agents pharmacologiques utilisés lors des expériences citées dans ce mémoire sont présentés à l'appendice A.

CHAPITRE 1

CARACTÉRISTIQUES DES INTERACTIONS LIGANDS/RÉCEPTEURS

Les neurones sont responsables de la production et de la propagation des messages nerveux qui assurent la grande majorité des fonctions dans le système nerveux central (SNC). Les neurones ont la capacité de transmettre l'information grâce à la présence d'une structure cellulaire complexe nommée synapse. À la jonction synaptique, l'activité électrique d'un neurone influence l'activité d'un autre neurone en produisant un changement du potentiel de membrane dans la cellule postsynaptique. Les signaux sont transmis à travers la fente synaptique par l'intermédiaire d'un médiateur chimique appelé neurotransmetteur. La terminaison axonale présynaptique libère le neurotransmetteur et influence les neurones postsynaptiques.

La grande majorité des agents pharmacologiques qui agissent sur le système nerveux le font en modifiant les échanges entre les neurones au niveau des synapses. Les agents pharmacologiques qui, en se liant à un récepteur, produisent une réponse semblable à celle qu'entraîne le

médiateur libéré à la synapse, porte le nom d'agoniste. On utilise le terme *agoniste* pour désigner un agent pharmacologique qui imite l'action d'un médiateur chimique qui se trouve normalement dans l'organisme (tableau 1). D'autre part, les agents qui se lient au récepteur mais ne peuvent l'activer sont décrits comme des antagonistes (tableau 1). En occupant les récepteurs, les antagonistes, dits compétitifs, empêchent la liaison du neurotransmetteur endogène quand il est libéré par la synapse. De plus, un antagoniste peut être non compétitif lorsqu'il se lie au récepteur sur un site différent de celui du neurotransmetteur. Dans les deux cas, ces antagonistes réduiront de façon substantielle la capacité d'activer les récepteurs concernés par les ligands endogènes.

1.1 La notion de récepteur

Un récepteur est un site de liaison spécifique, situé sur la membrane plasmique ou à l'intérieur de la cellule cible, auquel le médiateur chimique se lie (tableau 1). Les récepteurs semblent être constitués de deux composantes. D'une part, le site de reconnaissance ou de liaison du neurotransmetteur et d'autre part le site effecteur. Le site effecteur traduit la liaison du neurotransmetteur en une réponse biologique. Les récepteurs

utilisent trois mécanismes de transduction du signal : la régulation de canaux ioniques, le couplage à une protéine G et l'activité tyrosine kinase. Dans le premier cas, celui des récepteurs dits ionotropes, la liaison de l'agoniste au récepteur régule l'ouverture d'un canal ionique spécifique à certains ions. Le récepteur nicotinique présent sur les fibres musculaires constitue un exemple classique de récepteur ionotrope régulé par la liaison d'acétylcholine. Les récepteurs couplés à une protéine G, nommés récepteurs métabotropes, constituent une famille qui compte plus d'une soixantaine de membres. Ces récepteurs interagissent par l'intermédiaire d'une protéine G avec une protéine effectrice qui entraîne la formation d'un second messager comme l'AMP_c, le GMP_c, le diacylgcérol (DAG), l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) ou l'acide arachidonique. Enfin, les récepteurs des facteurs de croissance (p. ex., le récepteur de l'insuline, le récepteur EGF) se comportent comme des kinases, qui phosphorylent les résidus tyrosines de leurs protéines effectrices.

Il existe plusieurs méthodes d'étude des récepteurs, telles l'électrophysiologie, la radioliation, l'hybridation *in situ*, etc. Une revue de chacune de ces méthodes dépasse évidemment le cadre de ce mémoire. Nous nous limiterons à exposer les points importants de la méthode de radioliation qui constitue la base de mes résultats. L'interaction entre le

neurotransmetteur et le récepteur est du type clé-serrure et peut se comparer à l'interaction d'une enzyme avec son substrat à la différence près, que le récepteur ne modifie pas le neurotransmetteur. Les études de liaison spécifique des radioligands établissent l'accès au site de reconnaissance du récepteur, sans avoir la possibilité de déterminer si l'effecteur est situé ou non sur la même macromolécule.

Pour s'assurer que le radioligand est bien lié à un récepteur spécifique plusieurs critères doivent être respectés (Kenakin *et coll.*, 1992). D'abord il y a la cinétique : une liaison qui devrait être réversible et se produire à une vitesse raisonnable.

Deuxièmement, il faut que la distribution de la liaison corresponde à celle du neurotransmetteur. La liaison spécifique ne devrait être possible que dans les tissus où le neurotransmetteur et le récepteur sont présents.

En troisième lieu, le critère de saturabilité considère que le nombre de sites de liaison spécifique dans la préparation étudiée est fini. Autrement dit, si l'on ajoute suffisamment de radioligand, l'ensemble des sites spécifiques est marqué. En ce qui concerne la liaison non spécifique, elle n'atteint jamais un plateau, parce que le nombre de sites qu'elle peut

occuper, même si ceux-ci ont peu d'affinité, est pratiquement infini. Dans des conditions expérimentales, la liaison non spécifique augmente de façon linéaire jusqu'à des concentrations très élevées de radioligand. La liaison spécifique est donc nécessairement un phénomène saturable.

Enfin, le critère le plus important pour l'identification du site de liaison d'un récepteur est le profil pharmacologique. La spécificité d'un récepteur pour divers composés pharmacologiques (agoniste ou antagoniste) chimiquement apparentés au ligand endogène constitue l'une des caractéristiques principales permettant la discrimination des différents types de récepteurs. Par ailleurs, l'étude des effets physiologiques des agents pharmacologiques pour un récepteur donné permet de distinguer les agonistes et antagonistes préférentiels du complexe du récepteur en cause. La spécificité se définit comme étant la faculté d'un site de liaison de réagir avec un seul ou avec un nombre limité de types de molécules (tableau 1).

Peu de récepteurs satisfont à tous ces critères. Ainsi, on ne peut pas parler au sens strict de récepteur sigma puisque le ligand endogène qui interagit avec lui n'a pas encore été identifié. C'est pourquoi, il est plus rigoureux de parler de site sigma comme nous l'avons choisi de le faire.

1.1.1 Courbe de saturation

Les courbes de saturation sont utilisées pour déterminer les paramètres de radioliation du radioligand : le nombre maximal de sites de liaison (B_{\max}) et la constante de dissociation à l'équilibre (K_D). La K_D correspond à la concentration de radioligand qui s'attache à la moitié du B_{\max} . C'est un indice de l'affinité du radioligand pour le site de liaison. Ainsi, plus l'affinité du ligand pour un récepteur donné est *grande* plus la K_D pour ce récepteur est *petite*. En d'autres termes, plus la quantité de ligand nécessaire pour atteindre la demi-saturation est petite, plus l'affinité est grande.

Tableau 1.
Glossaire des termes biochimiques et pharmacologiques
concernant l'étude des récepteurs

Terme	Définition
Affinité	Force avec laquelle un messenger chimique se lie à son récepteur.
Agoniste	Messenger chimique qui se lie au récepteur et déclenche la réponse cellulaire. Se rapporte à un agent pharmacologique qui mime l'action d'un messenger normal.
Antagoniste	Molécule qui entre en compétition pour un récepteur avec un messenger chimique normalement libéré dans la fente synaptique. L'antagoniste se lie au récepteur mais ne déclenche pas de réponse cellulaire.
Compétition	Propriété de différentes molécules qui ont une structure apparentée de se combiner avec le même récepteur.
Hypersensibilité	Augmentation de la réponse d'une cellule cible à un messenger donné, par suite d'une régulation à la hausse.

Terme	Définition
Récepteur	Protéine spécifique située dans la membrane plasmique ou à l'intérieur d'une cellule cible (récepteur des hormones stéroïdes) et avec laquelle un messenger chimique se combine pour exercer son effet.
Régulation à la baisse	Diminution du nombre total de récepteurs cibles d'un médiateur donné en réaction à une concentration extracellulaire chronique forte du médiateur.
Régulation à la hausse	Augmentation dans le nombre total de récepteurs cibles d'un médiateur donné en réponse à une concentration extracellulaire chronique basse du messenger.
Saturation	Degré d'occupation de récepteurs par un médiateur. Si tous les sites sont occupés, les récepteurs sont saturés au complet ; si la moitié est occupée, la saturation est de 50 pour-cent, ainsi de suite.
Spécificité	Sélectivité. Propriété d'un récepteur de ne réagir qu'avec un seul type, ou bien un nombre limité, de molécules de structure semblable.

Pour obtenir une courbe de saturation, on utilise des concentrations croissantes de radioligand en présence d'une concentration fixe de récepteur. L'incubation dure jusqu'à l'obtention d'un équilibre où la vitesse d'association est égale à la vitesse de dissociation si bien que la liaison apparente est stable. On peut rapporter les résultats des courbes de saturation sur un graphique qui présente en ordonnée le ligand lié et en abscisse le ligand libre. La courbe de saturation représentée à la figure 5 est hyperbolique. La représentation de Scatchard (Scatchard, 1949) présente en ordonnée le rapport du ligand lié au ligand libre et en abscisse le ligand lié. On utilise la représentation de Scatchard pour faciliter la détermination de la K_D qui correspond à l'inverse de la pente et du B_{max} qui correspond à l'intersection de la droite avec l'axe des X. La précision de la détermination des paramètres dépend du respect des conditions expérimentales. Il faut en effet que i) la radioliasion augmente de façon linéaire en fonction de la concentration de protéine ii) que la quantité de radioligand lié représente une proportion négligeable ($<10\%$) de la quantité totale de radioligand iii) que la liaison non spécifique soit aussi petite que possible ($<50\%$).

En pratique, l'obtention d'une courbe linéaire par représentation de Scatchard signifie que le radioligand interagit avec un seul site de liaison.

Par contre, l'obtention d'une courbe non linéaire par représentation de Scatchard, nécessite en premier lieu, de vérifier les conditions expérimentales avant d'évoquer l'intervention de phénomènes de coopérativité, ou la présence d'une population hétérogène de sites de liaison spécifique, suggérant la présence de plusieurs récepteurs à affinité différente pour le radioligand (Klotz, 1982).

1.1.2 Courbe de compétition

On donne le nom de IC_{50} à la concentration de ligand non marqué qui inhibe 50% de la liaison du radioligand. En pratique, le IC_{50} est déterminé en réalisant une gamme de concentration d'inhibiteur en présence d'une concentration fixe de radioligand et de sites de liaison (figure 7). Si on connaît la concentration du radioligand ($[L^*]$) et sa K_D , l'équation de Cheng et Prusoff (1973) permet alors de calculer la constante d'inhibition (K_I) à partir de l' IC_{50} :

$$K_I = IC_{50} / 1 + ([L^*]/K_D)$$

Il est préférable d'utiliser la valeur K_I qui ne varie pas en fonction de la concentration de radioligand, contrairement à la valeur de l' IC_{50} . Ceci est

particulièrement important dans les études comparatives où l'on est amené à utiliser des concentrations en radioligand différentes. Les ligands qui possèdent une K_i faible, peuvent être considérés comme présentant une affinité plus grande pour le récepteur considéré.

1.3 Courbe de dissociation

Les courbes de dissociation servent à mesurer le temps de demi-dissociation ($t_{1/2}$) et la constante cinétique de dissociation (k_{-1}). On utilise une seule concentration de radioligand, habituellement une concentration égale ou inférieure à la K_D et une concentration fixe de protéine. On mesure la liaison spécifique en fonction du temps.

Expérimentalement, le radioligand et la préparation biologique comportant les sites de liaison sont incubés jusqu'à l'équilibre (ce qui permet de déterminer le radioligand lié à l'équilibre). Le radioligand est alors dilué avec un volume de tampon représentant 100 fois le volume d'incubation, ou par addition de ligand non marqué (ligand froid) pour obtenir une concentration 1000 fois supérieure à celle du radioligand. Le radioligand ne peut plus se réassocier avec les récepteurs libres et

l'équilibre est déplacé dans le sens de la dissociation. En reportant en ordonnée le logarithme népérien du rapport de la concentration de radioligand lié au temps t sur le ligand lié à l'équilibre et en abscisse le temps (t), on obtient une droite de pente k_{-1} . Le $t_{1/2}$ représente le temps auquel la concentration de radioligand lié au temps t est égale à la moitié de la concentration de radioligand à l'équilibre si bien que $\ln B_i / B_{eq} = \ln 0,5 = 0,693 = -k_{-1} \times t_{1/2}$ et $t_{1/2} = 0,693/k_{-1}$.

1.2 Caractéristiques pharmacologiques des récepteurs glutamatergiques

L'aspartate et le glutamate, des acides aminés dicarboxyliques, sont parmi les plus puissants neurotransmetteurs excitatrices du système nerveux central. Le glutamate régit l'activité de canaux cationiques et il concourt aux mécanismes qui sous-tendent les fonctions neurologiques les plus complexes, tel la mémoire et le développement du SNC. Ironiquement, l'activation excessive des récepteurs au glutamate représenterait une étape cruciale des processus de neurodégénérescence.

Il existe deux catégories de récepteurs glutamatergiques : les récepteurs métabotropes et les récepteurs ionotropes. Dans la figure 1,

nous avons illustré deux récepteurs ionotropes hétéromériques sensibles à l'action du glutamate, le récepteur NMDA et le récepteur AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole-4-propionique), ainsi que deux récepteurs métabotropes, le récepteur L-AP4 (2-amino-4-phosphonobutyrique) et le récepteur ACPD. L'antagoniste compétitif de chaque récepteur est encadré.

1.2.1 Les récepteurs métabotropes pour le glutamate

Les récepteurs glutamatergiques métabotropes sont liés par des protéines G à des enzymes cytoplasmiques. L'activation des récepteurs métabotropes peut produire, dans différents types de cellules, soit une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} consécutive à l'hydrolyse des phosphoinositides, une libération d'acide arachidonique consécutive à l'activation de la phospholipase D ou encore une modification du niveau de l' AMP_c .

Le *trans*-ACPD est un dérivé de l'acide aminocyclopentyl dicarboxylique capable de stimuler un sous-type de récepteur métabotrope pour le glutamate. Ce récepteur, nommé *trans*-ACPD, joue un rôle

important dans le développement du SNC. Par contre, une activation surabondante de ce récepteur en combinaison avec les autres types de récepteurs glutamatergiques (NMDA, AMPA, L-AP4, etc.) crée une période critique dans le processus de neurodégénérescence. L'enzyme intracellulaire pour ce récepteur est la phospholipase C (PLC). La phospholipase C catalyse la production d'IP₃ et de DAG à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). L'augmentation d'IP₃ dans le réticulum endoplasmique cytoplasmique déclenche la libération du Ca²⁺ stocké intracellulairement dans la cellule.

On ne connaît pas d'antagoniste sélectif du récepteur L-AP4, un dérivé γ -phosphonyl du glutamate (Nawy *et coll.*, 1990). L'enzyme intracellulaire du récepteur L-AP4 est la phosphodiesterase (PDE).

1.2.2 Les récepteurs ionotropes pour le glutamate

Les récepteurs glutamatergiques ionotropes se caractérisent par l'association des sites de liaison des agonistes et des canaux ioniques qu'ils régissent dans le même complexe macromoléculaire. Les récepteurs définis pharmacologiquement par le NMDA, l'AMPA et le kaïnate (KA) sont

membres de la super-famille des récepteurs-canaux, qui englobe les récepteurs cholinergiques nicotiniques, les récepteurs de type A de l'acide γ -aminobutyrique_A (GABA_A), les récepteurs inhibiteurs de la glycine et les récepteurs sérotoninergiques de type 3 (5-HT₃), pour ne nommer que ceux-là.

1.2.2.1 Les récepteurs non NMDA

Dans le SNC des mammifères, on trouve deux grandes classes de récepteurs ionotropes sensibles à l'action du neurotransmetteur glutamate. La première classe de récepteur réagit de façon spécifique à un analogue du glutamate, le *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA). Le récepteur NMDA se distingue d'une autre classe de récepteur, les récepteurs non NMDA. Parmi ceux-ci, on retrouve le récepteur sensible à l'action de l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole-4-propionique (AMPA). Les récepteurs AMPA sont distribués à travers tout le SNC et semblent servir de récepteurs pour la transmission synaptique rapide modulée par le glutamate. La plus haute densité de ces récepteurs se trouve au niveau de l'hippocampe, du cortex, du septum latéral, du striatum et de la couche moléculaire du cervelet. On peut distinguer le récepteur AMPA du récepteur NMDA par des agonistes sélectifs

(l'AMPA pour le récepteur AMPA, l'aspartate et le NMDA pour le récepteur NMDA). L'aspartate semble être inactif sur le récepteur AMPA. Il existe aussi des antagonistes sélectifs pour le récepteur AMPA. Un antagoniste compétitif puissant et sélectif du récepteur AMPA qui est le 6-nitro-7-sulphamobenzo[f]quinoxaline-2,3-dione (NBQX), ce dernier fait parti de la famille des quinoxalinediones. La plupart des quinoxalinediones ont un peu d'affinité pour le site de la glycine sur le récepteur NMDA à l'exception du NBQX (Patneau & Mayer, 1990).

Une partie de la liaison du [³H]glutamate aux membranes cérébrales est insensible au NMDA et à l'AMPA. Cette composante est déplacée par des toxines provenant des algues, comme les acides kaïnique et domoïque. Pour le récepteur du kaïnate qui fut étudié par la liaison de radioligand [³H]kaïnate, l'ordre d'affinité pour les agonistes sont : kaïnate > glutamate > AMPA ; en ce qui concerne le récepteur AMPA l'ordre est le suivant : AMPA > glutamate > kaïnate. Des études autoradiographiques révèlent une haute densité de la liaison du [³H]kaïnate sur certaines synapses, surtout dans le télencéphale, ce qui nous amène à croire que ces récepteurs ont une fonction synaptique (Barnard *et coll.*, 1991). Malheureusement, des antagonistes sélectifs du récepteur kaïnate ne sont pas encore disponibles, ce qui rend difficile l'étude de son rôle physiologique dans la transmission synaptique.

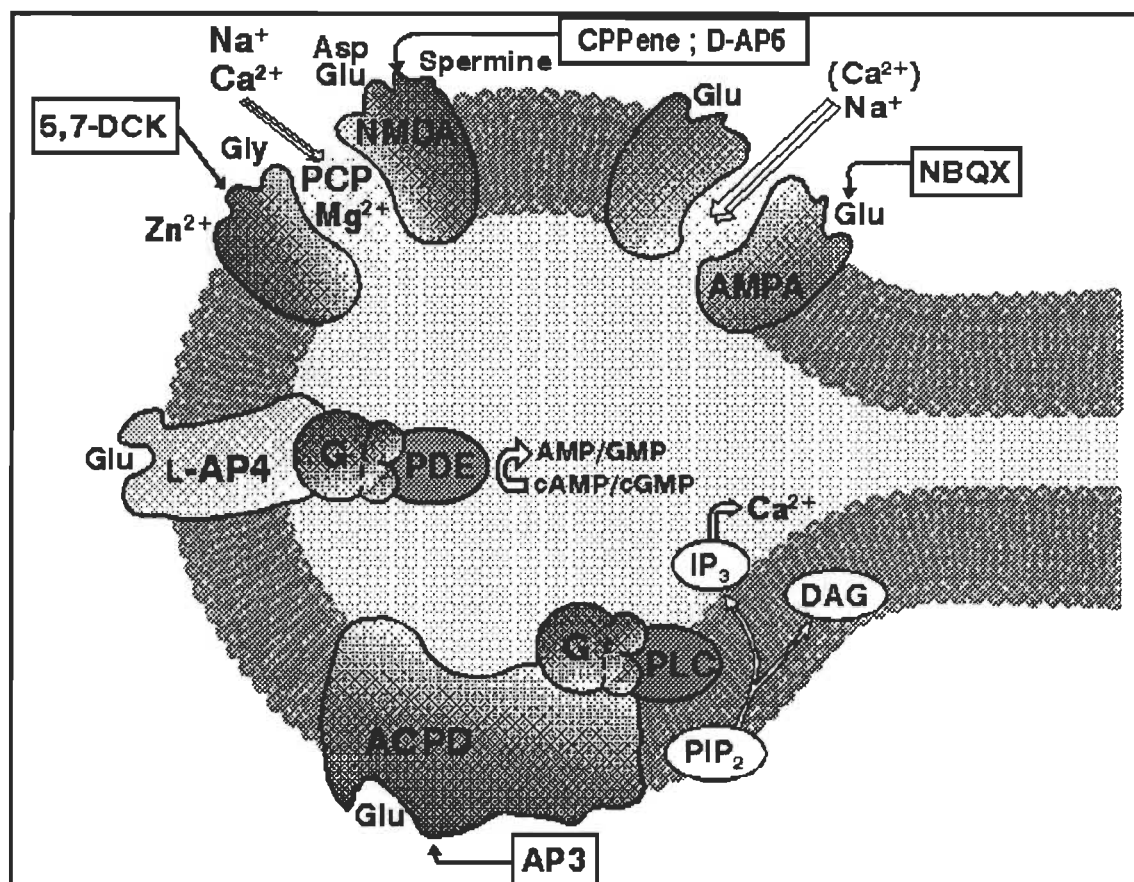


Figure 1. Vue moléculaire des quatre types de récepteurs glutamatergiques.

1.2.2.2 Propriétés des récepteurs NMDA

Le récepteur NMDA est très étroitement régulé et possède tout comme le récepteur GABA_A (acide gamma-aminobutyrique de type A) en plus du site de reconnaissance pour l'agoniste plusieurs sites de modulation. Il ne contient pas moins de cinq sites de liaisons endogènes qui influencent la probabilité de l'ouverture du canal ionique.

La figure 2 représente l'agencement et le fonctionnement hypothétiques de l'ensemble des composantes du complexe. L'activation du récepteur NMDA se traduit par l'ouverture d'un canal perméable aux cations. Il se produit donc une entrée d'ions Na⁺ et Ca²⁺ et une sortie d'ions K⁺. Il faut insister sur le fait que la perméabilité aux ions de Ca²⁺ est une propriété caractéristique des récepteurs NMDA. L'entrée de Ca²⁺ associée à l'activation du récepteur NMDA représente une étape essentielle des changements à long terme des fonctions des synapses survenant lors des processus de mémorisation ou de dégénérescence neuronale.

Les principaux sites physiologiques sont représentés à la figure 2. Divers agents pharmacologiques peuvent agir avec ces différents sites. Le

glutamate et son co-agoniste la glycine agissent sur deux sites de reconnaissance distincts sur ce récepteur. En outre, le canal du récepteur NMDA est bloqué par le Mg^{2+} et la phencyclidine. Le Zn^{2+} est un modulateur négatif et les polyamines, comme la spermine, sont des modulateurs positifs de l'activation du canal NMDA.

Les agonistes typiques du récepteur NMDA sont des acides aminés dicarboxyliques à chaîne courte comme le glutamate, l'aspartate et le NMDA. Jouant le rôle le plus conventionnel au site de liaison, le glutamate est le plus puissant agoniste endogène dans le cerveau des mammifères, suivi (par ordre de puissance) de l'L-homocystéate, de l'aspartate, de la cystéinesulfinate et du quinolate (Patneau & Mayer, 1990).

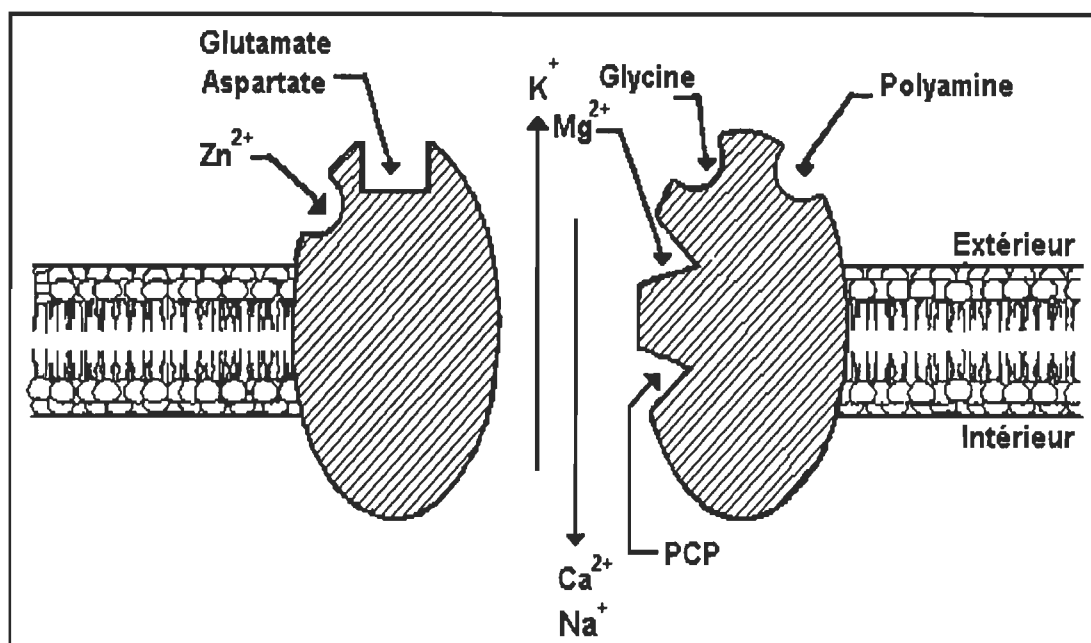


Figure 2. Représentation schématique de la structure du récepteur de type NMDA pour le neurotransmetteur glutamate.

Les antagonistes compétitifs du récepteur NMDA peuvent être formés à partir des agonistes correspondants en prolongeant la chaîne carboxylique, qui prend quelquefois une forme cyclique. La chaîne carboxylique en forme d'anneau augmente souvent la puissance de ces composés comme antagonistes : ceci se fait en choisissant le D-enantiomère et en remplaçant le groupement ω -carboxylique par un groupement phosphate tout en incorporant une liaison insaturée dans la chaîne carboxylique. Plusieurs antagonistes compétitifs sont disponibles pour le site de reconnaissance, cela inclut le 2-amino-4-phosphopentanoate (D-AP5), le 2-amino-4-phosphoheptanoate (AP7), l'acide carboxypropylphosphonique (CCP), le CGS19755, le CGP37849 et le LY233053 (Traynelis *et coll.*, 1991).

La glycine, agissant comme un agoniste allostérique, renforce la réponse du récepteur NMDA. Les antagonistes compétitifs du site de la glycine sont le 5,7-dichlorokynurenate, le L-689561 et le 5,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (MNQX) (Kleckner & Dingledine, 1988). Le site de la glycine sur le récepteur NMDA est pharmacologiquement distinct du site inhibiteur du récepteur de la glycine. Ainsi, le site de glycine sur le récepteur NMDA n'est pas bloqué par la strychnine et n'est pas activé par la β -alanine (Kemp *et coll.*, 1993).

En présence de glutamate, les polyamines endogènes, comme la spermine et la spermidine, augmentent la liaison de la dizocilpine (MK-801) ou du N-[1-(2-thiénnyl)cyclohexyl]-pipéridine (TCP) au récepteur NMDA. Cet effet est inhibé par divers antagonistes compétitifs du site glutamate associés au récepteur de type NMDA, l'acide 2-amino-4-phosphopentanoate (AP5), le 2-amino-4-phosphoheptanoate (AP7) et l'acide carboxypropylphosphonique (CCP). L'effet serait bien dû à une affinité des polyamines pour des sites spécifiques et non à une interaction générale de ces molécules avec la membrane car un agent pharmacologique, l'ifenprodil, a été utilisé pour illustrer l'interaction avec le site spécifique des polyamines (Marivon & Baudry, 1994). On a démontré que les sites de liaison des polyamines sont localisés sur la face externe de la membrane, puisque l'ajout de l'ifenprodil, qui a une affinité pour les sites des polyamines, cause un effet même en présence d'un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA (Hashimoto & London, 1993).

Le site de liaison du magnésium a la propriété de bloquer le passage des ions à travers le canal. Ce blocage, voltage-dépendant, se produit aux concentrations physiologiques de Mg^{2+} et atteint un maximum au potentiel

de repos de la cellule, ce qui confère aux réponses évoquées par le NMDA une forte sensibilité au voltage (Ascher & Nowak, 1988).

La phencyclidine en se liant à un site spécifique à l'intérieur du canal ionique de récepteur NMDA se comporte comme un antagoniste non compétitif du glutamate. Le site PCP se trouve à l'intérieur du canal du récepteur NMDA. Lorsque le site PCP est occupé, le canal est bloqué et les ions ne passent plus à travers le canal. La kétamine, un autre antagoniste non compétitif, bloque le canal sans inhiber la liaison du glutamate à son site de liaison en se liant au site PCP. D'autres dérivés, comme le TCP et le MK-801 sont encore plus actifs. Par ailleurs, ce type d'inhibition nécessite l'action préalable d'un agoniste, ce qui démontre que la liaison se produit sur le canal ionique à l'état ouvert (Javitt & Zukin, 1989b). De la même manière, la levée de l'inhibition dépend aussi de la présence d'un agoniste. En outre, l'inhibition et sa levée dépendent aussi du potentiel de membrane.

La phencyclidine agit sur un autre site, qu'on nomme site sigma. On ne peut pas proprement parler de récepteur sigma parce qu'on n'a pas identifié le ligand endogène. Le site sigma a une plus grande affinité pour les opiacés de synthèse que pour la phencyclidine. Autre différence intéressante, seul le site sigma est sensible à des neuroleptiques comme

l'halopéridol et certaines phénothiazines alors que le récepteur NMDA ne l'est pas. Il est cependant important de préciser que même si plusieurs antagonistes des récepteurs dopaminergiques D_2 agissent sur le site sigma, celui-ci n'est pas un récepteur dopaminergique. En effet, le site sigma est insensible à la dopamine et à l'apomorphine.

1.3 Propriétés des sites sigma

Martin et ses collègues (Martin *et coll.*, 1976) ont proposé que les récepteurs opiacés sigma sont les sites responsables des effets psychomimétiques et des comportements stimulateurs de la N-allylnormetazocine (SKF-10047 ou NAMN), de la cyclazocine et des opiacés apparentés. On a défini les sites sigma comme étant des sites de liaison différents des récepteurs opiacés puisqu'ils sont insensibles au naloxone. De plus, leur distribution anatomique est distincte de celle des récepteurs opiacés classiques μ , κ , δ . Il existe des différences dans la distribution des sites de liaison des récepteurs opiacés. Les différences sont remarquables dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus et dans le noyau caudé (Ofri *et coll.*, 1992). Un grand nombre de preuves (Zukin & Zukin, 1988) depuis ce temps ont indiqué que les récepteurs opiacés ne sont pas responsables des

effets psychomimétiques. Car premièrement, les effets des ligands sigma dans des expériences faites *in vivo* et *in vitro* ne sont pas affectées par l'antagoniste opiacé naloxone (Vaupel, 1983). Deuxièmement, les récepteurs opiacés sont sélectifs pour les énantiomères (-) des opiates contrairement aux sites sigma qui sont sélectifs pour les énantiomères (+). L'observation que beaucoup des agents opiacés qui produisent des effets psychotomimétiques se lient au site de la phencyclidine a mené au concept d'un récepteur sigma/PCP commun. Ce concept fut rapidement abandonné car on se rendit compte que le site sigma et le site PCP sont deux sites distincts.

Les sites sigma se trouvent abondamment dans le cerveau et dans la moelle épinière ainsi que dans le coeur, la rate, les glandes surrénales, les reins, les ovaires, les testicules, le tube digestif et le foie, ce qui suggèrent ainsi une multitude de fonctions (Su, 1991). La distribution des sites sigma dans le cerveau se trouve dans le cortex, le cervelet, le thalamus et dans l'hippocampe (Weissman *et coll.*, 1990). Le site sigma n'a pas été encore cloné avec succès, sa structure moléculaire peut donc seulement être déduite à partir des ligands qui ont une affinité pour lui.

Le site sigma pourrait être associé à des maladies communes. L'administration d'agonistes sigma sélectifs à des rats induisent un comportement psychotique (Walker *et coll.*, 1990). Plusieurs médicaments neuroleptiques efficaces ont une haute affinité pour les sites sigma (Largent *et coll.*, 1988). L'halopéridol, un neuroleptique typique, est un antagoniste des sites sigma et des récepteurs dopaminergiques D₂. Par ailleurs, les neuroleptiques typiques ont le désavantage de provoquer des effets secondaires extrapyramidaux puisqu'ils bloquent les récepteurs dopaminergiques (Chavkin, 1990 ; Ferris *et coll.*, 1986 ; Taylor *et coll.*, 1987). On peut seulement déduire que les sites sigma ne produisent pas d'effet extrapyramidaux en présence d'halopéridol. On ne connaît pas encore les effets secondaires que les sites sigma produisent lorsqu'ils sont activés ou inhibés.

En faisant des études de liaison sur des homogénats de tissu cérébral de cortex humain, Weissman *et coll.* (1991) ont observé une augmentation importante de la population des sites sigma dans le cerveau des schizophrènes quand on les compare à des cerveaux témoins normaux et à des cerveaux de victimes de suicide. Cette dernière équipe a aussi trouvé une augmentation de 2 à 3 fois de la densité des sites sigma dans des tumeurs malignes neuronales et non neuronales excisés à partir de cerveau humain quand on les compare à

des tissus témoins provenant de la même région. Tous ces résultats indiquent un rôle possible des sites sigma dans la pathogénèse de la schizophrénie et du cancer.

1.3.1 L'existence de deux sites sigma

Des études biochimiques (Largent *et coll.*, 1986 ; Sircar *et coll.*, 1986 ; Kushner *et coll.*, 1988) ont démontré au moins deux sites qui lient des ligands sigma. Bien qu'on le considère comme un ligand très sélectif pour les sites sigma et dépourvu d'activité sur le site PCP du récepteur NMDA, le DTG se lie avec une grande affinité à deux sites de liaison avec haute affinité (Rothman *et coll.*, 1991). Un de ces deux sites (le site sigma-1) ressemble beaucoup au site sigma neuronal (le site sigma-2) qui est bien caractérisé dans des études de radioliation. Il montre aussi une sélectivité identique du profil du ligand avec le site de liaison sigma sensible au dextrométhorphan (Musacchio & Klein, 1988 ; Klein et Musacchio, 1989 ; Musacchio *et coll.*, 1989). Ce site montre une haute affinité pour des agents pharmacologiques antitussifs et anticonvulsants (le site sigma-1). L'autre site, le site sigma-2, a une faible affinité pour presque tous les ligands sigma, à l'exception du DTG et de l'halopéridol. On suppose que

les sites sigma-2 sont responsables des effets dystoniques des ligands sigma, c'est-à-dire une perturbation du tonus musculaire (Walker *et coll.*, 1988 ; Matsumoto *et coll.*, 1990). L'halopéridol et le DTG, les ligands sigma les plus utilisés, ne font pas de distinction entre ces deux sous-types de récepteurs. La liaison des agents sigma au site sigma-1 est modulée par la guanosine triphosphate (GTP), alors que la liaison des agents sigma au site sigma-2 ne l'est pas (Yamamoto *et coll.*, 1995). Ces résultats suggèrent que le site sigma-1 est couplé à une protéine G.

Il n'est pas encore clair si les sites sigma-1 et sigma-2 sont liés entre eux d'une façon quelconque, mais ils ont la capacité de se lier aux mêmes agents pharmacologiques, c'est-à-dire au DTG et à l'halopéridol. La purification et le séquençage des récepteurs ou leur clonage nous permettra de clarifier leurs relations avec les autres récepteurs et de trouver la structure de sigma-1 et sigma-2.

1.4 Les protéines G

De nombreux récepteurs transmettent, par l'intermédiaire de protéines G spécifiques, les instructions que les neurotransmetteurs ou

d'autres «premiers messagers» extracellulaires véhiculent. La plupart des récepteurs métabotropes sont couplés à une structure membranaire active qui porte le nom de protéine G. La protéine G ainsi nommée car elle lie les nucléotides guanyliques (GDP,GTP). Les protéines G sont fixées à la face cytoplasmique de la membrane cellulaire, et elles agissent sur des effecteurs. Les effecteurs sont des enzymes qui convertissent un précurseur inactif en un «second messenger» actif. Le second messenger diffuse dans le cytoplasme, où il transmet le signal en déclenchant une cascade de réactions moléculaires qui modifient le comportement cellulaire. La liaison d'un agoniste à un récepteur permet d'activer la protéine G associée qui, elle-même, active un effecteur.

Les protéines G se composent de trois sous-unités protéiques (α,β,γ). La sous-unité α est la partie la plus spécifique de la molécule. Dans des conditions non dénaturantes, les sous-unités β et γ restent étroitement associées, la sous-unité α se dissociant du complexe $\beta\gamma$. La sous-unité α de chaque protéine G est distincte et détermine la spécificité de la protéine G donnée. Les protéines G sont associées à la face cytoplasmique de la membrane plasmique par des liaisons hydrophobes ou par acylations.

1.4.1 Les toxines inhibant les protéines G

Certaines toxines bactériennes ont des effets importants sur la fonction des protéines G. Ces toxines activent ou inactivent en permanence les protéines G en catalysant le transfert (une ADP-ribosylation) d'un groupe ADP ribose du NAD (qui est un cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques) sur un résidu cystéine ou arginine, agissent avec le site GTP-dépendant de la protéine G.

La toxine pertussique, produite par *Bordetella pertussis*, est responsable, entre autres, de la coqueluche. Cette toxine est une des mieux connues. Après leur ADP-ribosylation par la toxine pertussique, les protéines G sont stabilisées dans l'état $\alpha\beta\gamma$ si bien que leur liaison aux récepteurs activés est totalement inhibée. La toxine pertussique inhibe donc les effets des neuromédiateurs. Cette toxine supprime l'action des récepteurs inhibiteurs de l'adénylate cyclase en bloquant leur interaction avec la protéine G_i .

D'une manière analogue, la toxine cholérique ADP-ribosyle diverses protéines G. Bien que cette toxine catalyse la même modification covalente, le résultat fonctionnel est différent car la sous-unité α reste liée

d'une manière permanente au GTP (mais pas sur le même acide aminé), ce qui entraîne une augmentation de la production de seconds messagers. La famille des protéines G_s est sensible à la toxine cholérique. Lorsque la toxine cholérique agit sur la protéine G_s , elle stimule l'adénylate cyclase, et augmente la production d'AMP_c.

1.5 Interaction *in vivo* d'un ligand sigma

Plusieurs chercheurs ont mis en évidence l'interaction entre le site sigma et le récepteur NMDA (Monnet *et coll.*, 1990, 1992 ; Rao *et coll.*, 1991 ; Debonnel *et coll.*, 1990 ; Yamamoto *et coll.*, 1995). Alors que d'autres chercheurs (Malouf *et coll.*, 1988 ; Fletcher *et coll.*, 1993) ne voient aucune interaction entre le site sigma et le récepteur NMDA. Ceci s'explique par le fait que ces derniers chercheurs utilisent des méthodes qui diffèrent de ceux utilisées par Monnet *et coll.* (1990, 1992), Rao *et coll.* (1991), Debonnel *et coll.* (1990) et Yamamoto *et coll.* (1995). Nous avons effectué nos expériences biochimiques en se basant sur les résultats obtenus par les groupes de chercheurs, plus précisément le groupe de Monnet *et coll.* (1990 , 1992), qui voit une interaction entre le site sigma et le récepteur NMDA.

Monnet *et coll.* (1990, 1992) ont fait des injections i.v. d'agents sigma à des rats. Ils ont mesuré électrophysiologiquement le nombre de potentiels d'action provoqués par l'injection microiontophorétique de *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans les cellules CA3 de l'hippocampe. Ils ont remarqué une augmentation de la réponse du récepteur NMDA en présence d'un agoniste des sites sigma, le 1,3-di(2-tolyl)-guanidine (DTG). Par contre, ils n'ont pas noté d'augmentation de la réponse du récepteur NMDA lorsque l'halopéridol (un neuroleptique), un antagoniste des sites sigma est ajouté avant le DTG. Ces résultats les amènent à croire que les agonistes des sites sigma modulent le récepteur NMDA sans qu'ils puissent expliquer le mécanisme en cause.

1.6 Hypothèse et objectif du projet de recherche

Comme nous venons de le décrire, des études en électrophysiologie (Monnet *et coll.*, 1990, 1992 ; Debonnel *et coll.*, 1990) ont démontré que le DTG, un agoniste des sites sigma, peut augmenter l'activité induite par le NMDA dans les neurones de l'hippocampe. Cette augmentation d'activité est inhibée par l'halopéridol, un antagoniste des sites sigma.

Le but de notre étude est de déterminer biochimiquement quels sont les effets de la modulation des sites sigma, sur les paramètres de liaison du site PCP des récepteurs NMDA (figure 3). Nos travaux consistent à mettre en évidence la modulation du récepteur NMDA par les sites sigma. Pour ce faire nous utiliserons des préparations de synaptosomes faites à partir de cortex de rat. Les préparations synaptosomales sont un modèle du neurone qui permet d'étudier les seconds messagers et aussi d'investiguer les régulations intracellulaires. Les synaptosomes correspondent à des terminaisons nerveuses, reconstitués après homogénéisation dans un milieu d'incubation qui se rapproche des concentrations ioniques physiologiques (Dunkley *et coll.*, 1986). Les préparations synaptosomales seront traitées avec un ligand sigma (p. ex., le DTG) et nous mesurerons la radioliasion du [³H]MK-801, un antagoniste non compétitif du site PCP du récepteur NMDA.

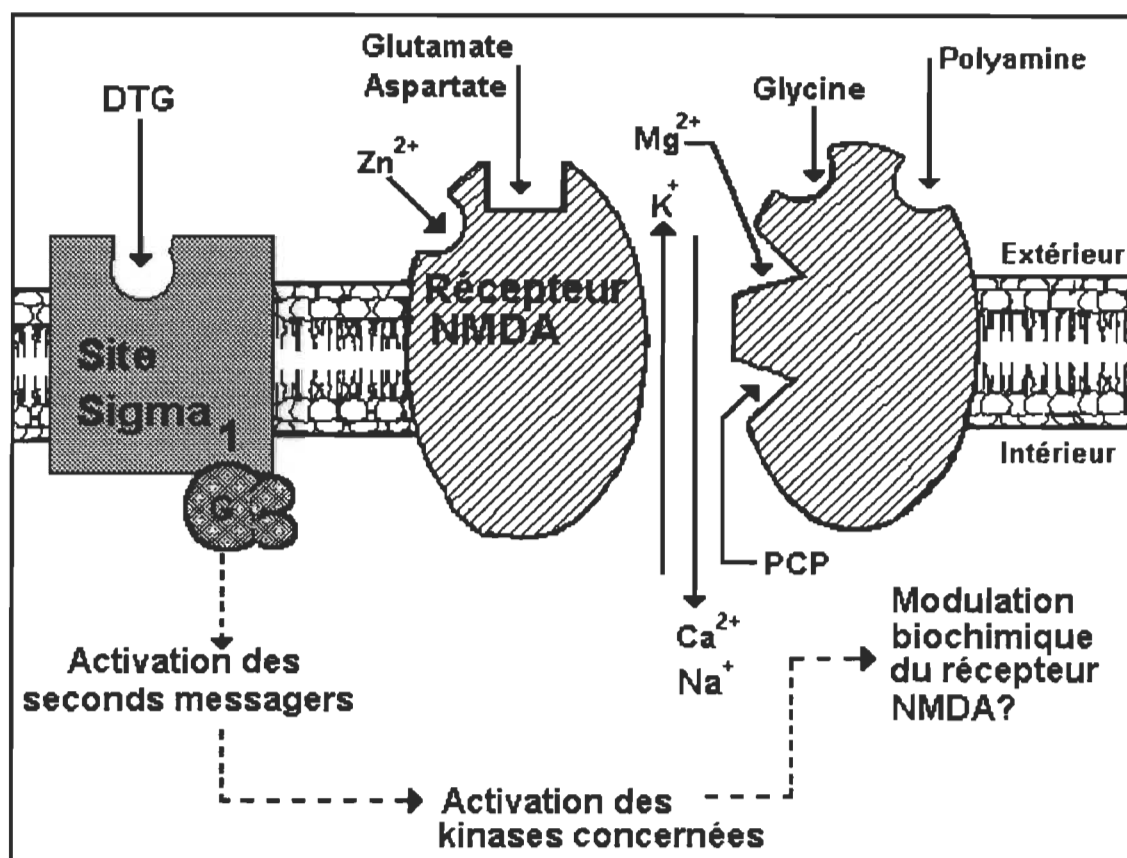


Figure 3. Représentation schématique de l'hypothèse postulée de la modulation du récepteur NMDA par les sites sigma.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Matériels

Les rats Sprague-Dawley ont été élevés chez Charles River (Saint-Constant, Québec). Le [^3H]MK-801 (activité spécifique 22 Ci/mmol) provient de Dupont NEN Products. Le (+)MK-801, le DTG, le glutamate, l'halopéridol et le sulpiride ont été obtenus de Research Biochemicals International (RBI). La kétamine et le Percoll ont été achetés chez Sigma et le réactif de Bradford chez Bio-Rad. Tous les autres produits et solutions sont de qualité chromatographique.

2.2 Préparation des synaptosomes

Les synaptosomes ont été préparés selon la méthode de Dunkley *et coll.* (1986) avec de légères modifications. Dans cette étude, nous avons utilisé des rats mâles Sprague-Dawley (pesant de 275 à 325 g), qui sont sacrifiés par décapitation. Le cerveau est enlevé rapidement de la boîte

crânienne. À l'aide d'une lame de rasoir, on enlève le cervelet et on sépare les deux hémisphères cérébraux. Chaque hémisphère repose sur le cortex de façon à exposer la face ventrale. Nous enlevons le mésencéphale puis l'hippocampe et enfin les noyaux gris centraux ou le diencephale de façon à ne garder que le cortex. Toutes ces étapes sont exécutées à 4°C, sauf indication contraire. Chaque moitié de cortex est homogénéisée, en utilisant un homogénéiseur de verre/Téflon, dans 9 ml de tampon de suspension froid constitué de sucrose 0,32 M, d'acide éthylène diaminotétracétique (EDTA) 1 mM et de dithiothréitol (DTT) 0,25 mM, pH 7,4.

Les homogénats sont centrifugés à $1\,500 \times g$ pendant 10 minutes, pour enlever les débris cellulaires, la substance blanche et les méninges qui ont pu rester sur le cortex. Le surnageant est soigneusement prélevé avec une pipette Pasteur et conservé dans la glace pendant que les culots sont resuspendus dans le tampon de suspension et centrifugés de nouveau à $1\,500 \times g$ pendant 10 minutes. Les surnageants de ces deux centrifugations sont mis en commun et centrifugés à $23\,700 \times g$ pendant 30 minutes à 4°C. Les culots obtenus, qui forment la fraction P_2 , sont

homogénéisés dans du tampon de suspension froid avec un homogénéiseur verre-verre et le volume est ajusté de façon à obtenir une concentration de protéine qui est approximativement de 3,75 mg/ml (selon la méthode de dosage des protéines de Bradford (Bradford *et coll.*, 1979)).

L'isolation de la fraction P_2 sur le gradient de Percoll nous permet de séparer, après la centrifugation, les synaptosomes des mitochondries et de la myéline. Le gradient de Percoll (3%, 10% et 23%) est préparé comme suit, en ce qui concerne le 23%, 23 ml de Percoll, 25 ml de tampon «sucrose 4x» 1,28 M de sucrose, 4 mM d'EDTA, 1 mM de DTT, pH 7,4 et le volume d'eau distillée déminéralisée nécessaire pour compléter (le volume) à 100 ml. Une procédure comparable est utilisée pour les autres concentrations de Percoll (3% et 10%). Nous déposons très délicatement 2 ml de chacune des trois concentrations, en commençant par la plus concentrée, dans un tube de centrifugation de 10 ml en polycarbonate.

L'étape suivante consiste à déposer délicatement 2 ml de la fraction P_2 sur le gradient discontinu de Percoll extemporané. Les tubes contenant les gradients et la fraction P_2 sont alors placés dans un rotor à angle fixe (32°) JA20 de Beckman, puisque c'est à cet angle que la séparation des différentes phases est la meilleure. Les gradients sont ensuite centrifugés à

48 000 $\times g$ pendant 7 minutes. Après la centrifugation, le surnageant qui se trouve en haut de la concentration de 3% de Percoll est constitué de myéline, les culots contiennent des mitochondries et l'interface entre la concentration de Percoll 10%-23% est constitué de synaptosomes. Cette interface est recueillie (environ 10 ml) et diluée dans un volume total de 30 ml de tampon d'incubation physiologique (Ringer modifié) qui est constitué de (en mM) NaCl 110, Hepes 11,5, NaHCO₃ 24 et du glucose 8,3, pH 7,4.

Les synaptosomes sont lavés par centrifugation à 39 000 $\times g$ pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer le Percoll. Le culot qui contient les synaptosomes est resuspendu dans 10 ml de tampon d'incubation physiologique et centrifugé à 9 800 $\times g$ pendant 7 minutes à 4°C. Finalement, le culot est resuspendu dans le tampon d'incubation physiologique. Le volume est ajusté de façon à obtenir une concentration de protéine d'environ 0,5 mg/ml (selon la méthode de dosage des protéines de Bradford (Bradford *et coll.*, 1979)).

2.2.1 Traitement pharmacologique des synaptosomes

Toutes les préparations de synaptosomes, y compris même les préparations témoins qui ne subissent aucun traitement pharmacologique, sont incubées pendant 50 minutes à la température ambiante de la pièce (25°C) (figure 4).

S'il y a lieu, l'ajout de 1,3-di(2-tolyl)-guanidine (DTG), un agoniste des sites sigma, se fait toujours 30 minutes avant la fin de l'incubation. Des études préliminaires ont montré que cette période de 30 minutes est nécessaire à l'apparition des effets du DTG. Si des antagonistes (halopéridol, sulpiride) sont ajoutés, ils le sont 40 minutes avant la fin de l'incubation, soit 10 minutes avant l'ajout du DTG et 10 minutes après le début de l'incubation. Nous ajoutons l'antagoniste 10 minutes avant l'agoniste pour que l'antagoniste occupe tous les sites sigma. Si nous ajoutons seulement un antagoniste, nous le faisons 40 minutes avant la fin de l'incubation (figure 4). La période de 10 minutes avant l'ajout de tout agent pharmacologique est nécessaire à la stabilisation des synaptosomes.

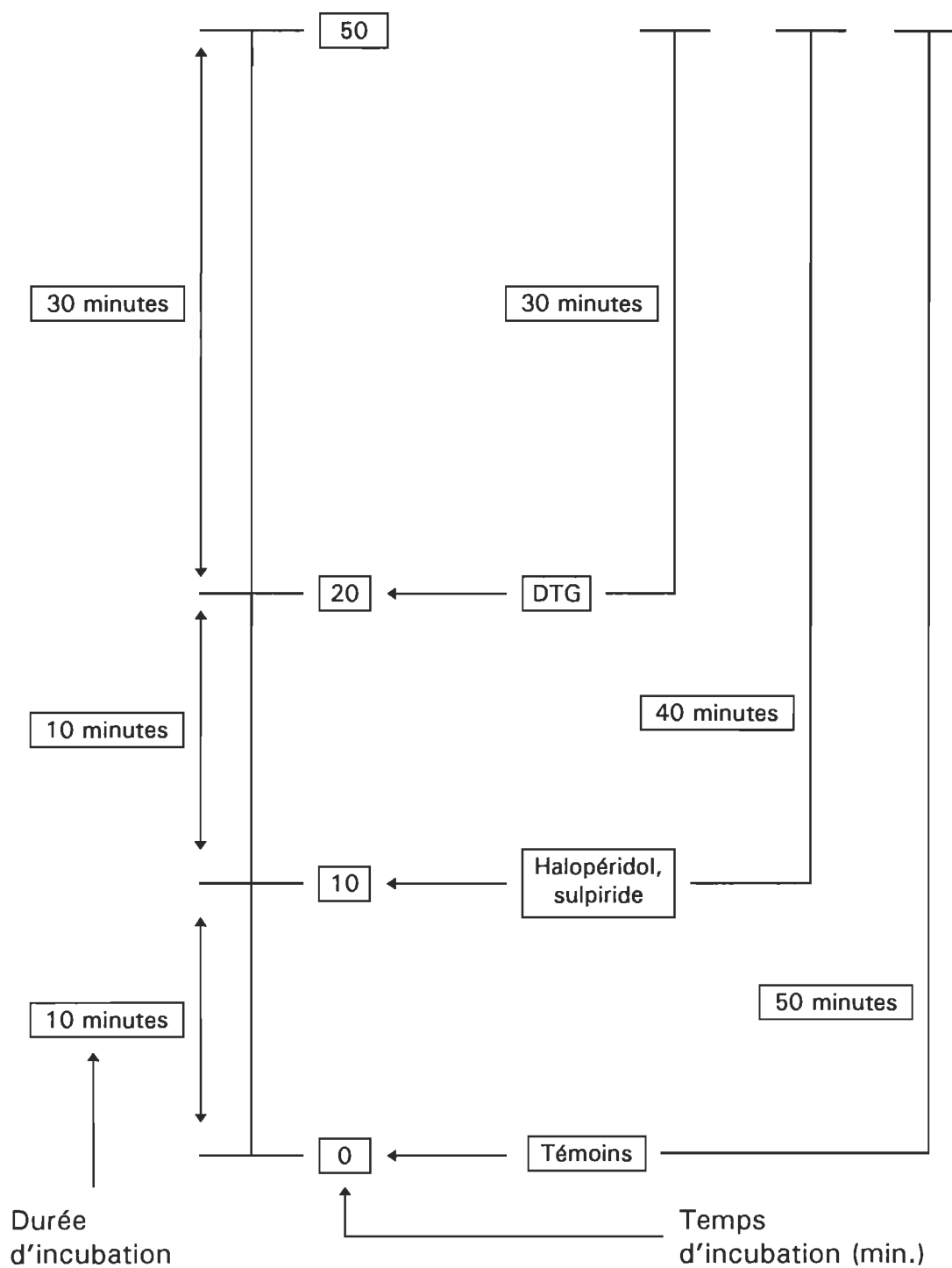


Figure 4. Déroulement temporel des traitements pharmacologiques.

Après l'incubation, les synaptosomes sont centrifugés à $9\,800 \times g$ pendant 7 minutes à 4°C. Cette centrifugation permet d'éliminer les agents pharmacologiques utilisés pendant l'incubation. Le culot est alors resuspendu dans un volume de tampon d'incubation physiologique pour atteindre une concentration de protéine d'environ 0,5 mg/ml (selon la méthode de dosage des protéines de Bradford *et coll.* (1979). La suspension finale est utilisée pour les études de radioliation.

2.2.2 Études de radioliation sur les synaptosomes

La radioliation consiste ici à mettre en présence les synaptosomes resuspendus dans le tampon d'incubation physiologique avec le ligand radioactif [^3H]MK-801 (22 Ci/mmol). Les études de radioliation sont effectuées dans un volume final de 200 μl . La radioliation non spécifique est toujours mesurée en présence de 200 μM de kétamine. Les échantillons sont incubés pendant 60 minutes à 25°C ; ces conditions permettent d'atteindre rapidement l'équilibre.

Nous mettons un terme à l'incubation en filtrant rapidement le milieu d'incubation à travers des filtres Whatman GF/C. Les filtres sont lavés

deux fois avec 3 ml de tampon d'incubation physiologique froid. Le filtre est placé dans une fiole avec du liquide de scintillation. Les fioles sont placées dans le compteur de scintillation liquide et le comptage s'effectue pendant 5 minutes pour chaque fiole.

Les courbes de saturation sont engendrées à partir des données obtenues avec les 10 concentrations de [^3H]MK-801 qui varient de 0,2 à 40 nM. Certaines courbes de saturation sont établies à partir de dilution isotopique en présence de 10 nM [^3H]MK-801 et nous augmentons progressivement la concentration du MK-801 non marqué de 10 nM jusqu'à 500 nM. Les courbes de saturation sont analysées avec le programme Ligand (McPherson, 1983).

Les études d'inhibition sont exécutées, en présence de 40 nM [^3H]MK-801, avec 10 concentrations de chaque inhibiteur allant de la concentration 10^{-9} à 10^{-4} M.

Le DTG est dilué dans une solution de méthanol 50%. L'halopéridol et le MK-801 sont dilués dans une solution d'éthanol 85%. La kétamine est diluée directement dans le tampon d'incubation physiologique.

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'erreur-type d'au moins trois expériences différentes. Les différences statistiques sont évaluées avec le test-*t* de Student.

2.2.3 L'introduction de molécules non diffusibles dans les synaptosomes

L'introduction de molécules non diffusibles dans les synaptosomes s'effectue par la technique du «freeze/thaw» (Nichols *et coll.*, 1989). Cette technique consiste à congeler rapidement et brièvement la préparation synaptosomale en présence d'un cryoprotectant, le diméthylsulfoxyde (DMSO). La congélation, en présence d'un cryoprotectant, permet de perméabiliser de façon réversible et rapide la bicouche lipidique et ainsi de laisser entrer les macromolécules non diffusibles comme la toxine pertussique.

La préparation de synaptosomes est resuspendue dans un volume suffisant de tampon d'incubation physiologique oxygéné pour obtenir une concentration de 1 mg de protéine/ml. Le tampon d'incubation physiologique est oxygéné avec un mélange gazeux 95% O₂/5% CO₂. Comme les synaptosomes sont une fraction cellulaire vivante, on

comprendra la nécessité de fournir de l'oxygène pour en préserver l'intégrité des fonctions durant une longue incubation. Nous mélangeons la préparation synaptosomale avec un volume égal de DMSO (10%,v/v) dilué dans le tampon d'incubation physiologique.

Nous avons ajouté la toxine pertussique (100 nM) aux préparations de synaptosomes avant l'incubation de 10 minutes dans un bain d'eau maintenu à 4°C. Par la suite, nous incubons les préparations synaptosomales à -20°C pendant 10 minutes. Les préparations congelées sont alors transférées dans le bain d'eau maintenu à 4°C pendant 10 minutes. À la fin de la période de décongélation, les synaptosomes sont incubés pendant une heure à la température ambiante avant l'ajout du DTG. Les synaptosomes sont ensuite incubés pendant 30 minutes à la température de la pièce. Pour le témoin, le temps d'incubation est aussi d'une heure et demie.

Après l'incubation totale d'une heure et demie, les synaptosomes sont centrifugés à $9\,800 \times g$ pendant 7 minutes à 4°C. Le culot est alors resuspendu dans un volume de tampon d'incubation physiologique pour atteindre une concentration de protéine d'environ 0,5 mg/ml selon la

méthode de dosage des protéines de Bradford (Bradford *et coll.*, 1979). La suspension finale est utilisée pour les études de radioliation.

2.3 Dosage des protéines

Les concentrations de protéines sont déterminées par la méthode colorimétrique de Bradford *et coll.* (1979) avec des immunoglobulines (IgG) pour établir la courbe étalon. Pour 50 μ l de synaptosomes à doser, nous ajoutons 2,5 ml de colorant Bio-Rad. Après 5 minutes, on fait une lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. Les autres tubes utilisés pour cette méthode sont des témoins (contenant 50 μ l de tampon d'incubation physiologique (Ringer) dans le cas des synaptosomes) et des tubes contenant des concentrations croissantes d'IgG de façon à établir une courbe étalon.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Des données électrophysiologiques et pharmacologiques récentes montrent une augmentation de la réponse des récepteurs glutamatergiques de type NMDA après l'administration de ligands reconnus pour agir sur les sites sigma (Monnet *et coll.*, 1990, 1992 ; Debonnel *et coll.*, 1990). Mon travail de maîtrise consistera à démontrer que les changements des réponses glutamatergiques induites par les ligands sigma sont assurés par des modifications des paramètres biochimiques des récepteurs NMDA pour le neurotransmetteur glutamate. L'ensemble de mon expérimentation pour évaluer cette possibilité d'une altération biochimique des récepteurs NMDA par les sites sigma reposera sur l'utilisation d'une préparation *in vitro* de terminaisons nerveuses libres en suspensions, connue sous le nom de synaptosomes. Le choix de cette préparation tissulaire qui représente les synaptosomes nous permettra d'étudier les mécanismes biochimiques capables de moduler les récepteurs NMDA pour le glutamate. La préparation de synaptosomes fut au cours des dernières années utilisée comme modèle *in vitro* de terminaisons neuronales et en particulier pour préciser le rôle de divers

systèmes de seconds messagers dans le contrôle de la fonction synaptique. Nous nous intéressons spécifiquement à évaluer le rôle des systèmes cellulaires endogènes dans la régulation du récepteur NMDA par les ligands sigma.

3.1 Effet des ligands sigma sur la modulation du récepteur NMDA

Nous avons effectué des courbes de saturation pour déterminer les paramètres de liaison du [^3H]MK-801. Le MK-801 se lie sur le site PCP du récepteur NMDA (Wong *et coll.*, 1988). À la figure 5, on trouve une courbe de saturation du [^3H]MK-801 exprimée en ordonnée par le ligand lié, représenté en pmol/mg de protéine, et en abscisse, le ligand libre exprimé en nM. Nous pouvons remarquer que la liaison du [^3H]MK-801 à son site récepteur ne parvient pas à la saturation.

Les données obtenues par une étude de saturation peuvent être représentées sur une courbe de Scatchard (figure 6). La représentation de Scatchard (1949), nous permet d'obtenir une estimation de la K_D et du B_{max} . La K_D nous indique l'affinité du ligand radioactif pour le site en question. Plus

la K_D est petite plus l'affinité pour le site est grande. Le B_{max} nous indique une estimation de la densité des récepteurs.

Nous pouvons voir sur la figure 6 que nos points arrivent seulement vers le milieu de la courbe, puisque nous n'arrivons pas à saturer, il faut donc extrapoler la droite jusqu'à l'abscisse. Cette extrapolation permet d'estimer le B_{max} . Grâce à cette extrapolation, nous avons estimé un B_{max} de $2,14 \pm 0,12$ pmol/mg de protéine et une K_D de 38,1 nM.

Dans des conditions témoins, le [3H]MK-801 se lie aux préparations de synaptosomes avec une constante de dissociation à l'équilibre (K_D) de $38,1 \pm 0,2$ nM. Le nombre de sites de liaison (B_{max}) est de $2,14 \pm 0,12$ pmol/mg de protéine.

Nous avons fait des courbes de compétition sur des préparations synaptosomales pour déterminer l' IC_{50} , c'est-à-dire la concentration d'agoniste ou d'antagoniste nécessaire pour inhiber 50 % de la liaison du ligand radioactif. Connaissant la valeur de la concentration du radioligand ($*L$) et de sa K_D , l' IC_{50} permet alors de calculer la constante d'inhibition (K_I) en utilisant l'équation de Cheng et Prusoff (1973). Il est préférable d'utiliser la valeur du K_I qui ne varie pas en fonction de la concentration du radioligand, contrairement à

la valeur du IC_{50} . Il est important de noter que la concentration du ligand radioactif est constante. Voici l'ordre de puissance (K_i) que nous avons obtenu pour les différentes substances pour le site PCP du complexe récepteur NMDA en présence de 40 nM de [3H]MK-801 : MK-801 ($6,6 \times 10^{-8}$ M) < kétamine ($8,8 \times 10^{-7}$ M) < DTG ($8,7 \times 10^{-5}$ M). Nous pouvons voir que le MK-801 a une haute affinité pour le site PCP, contrairement au DTG qui a peu d'affinité pour ce site. L'halopéridol n'interagit pas avec le site PCP du récepteur NMDA.

Il est intéressant de noter qu'en ajoutant un agoniste des sites sigma, le DTG, la constante de dissociation diminue. Lorsque la K_D diminue, cela indique que l'affinité du site PCP pour le [3H]MK-801 augmente. L'ajout d'une concentration de DTG 10^{-6} M diminue la K_D de façon non significative à $29,6 \pm 0,4$ nM. Le nombre de sites de liaison est de $2,63 \pm 0,30$ pmol/mg de protéine. En utilisant une concentration plus faible de DTG, c'est-à-dire 10^{-7} M et de 10^{-8} M, la K_D devient respectivement $23,8 \pm 0,3$ nM et $22,8 \pm 0,2$ nM ($P < 0,005$) (figure 8). C'est à la concentration de 10^{-8} M que l'effet du DTG est maximal. Les courbes de déplacement (figure 7) montrent qu'à la concentration 10^{-6} M le DTG interagit un peu avec le site PCP du récepteur NMDA, alors qu'à la concentration 10^{-8} M le DTG n'interagit plus avec le site PCP. En ce qui concerne les B_{max} , pour la concentration de DTG 10^{-7} M, il est

de $2,02 \pm 0,24$ pmol/mg de protéine et pour la concentration de DTG 10^{-8} M le B_{\max} est de $2,22 \pm 0,15$ pmol/mg de protéine. En ce qui concerne les concentrations allant de 10^{-9} M à 10^{-12} M de DTG, les K_D restent inférieures ($P < 0,02$) (figure 8), mais l'effet est moins grand puisque les concentrations sont très faibles. L'effet n'est plus significatif à la concentration de 10^{-13} M ($K_D = 34,1 \pm 0,3$ nM ; $B_{\max} = 2,40 \pm 0,22$ pmol/mg de protéine).

Nous bloquons l'effet du DTG avec un antagoniste des sites sigma et de la dopamine, l'halopéridol. En ajoutant une concentration d'halopéridol de 10^{-6} M en présence de DTG 10^{-7} M, la K_D est de $41,8 \pm 0,4$ nM et le B_{\max} de $1,95 \pm 0,32$ pmol/mg de protéine (témoins $K_D = 38,1 \pm 0,2$ nM et le $B_{\max} = 2,14 \pm 0,12$ pmol/mg de protéine). En ajoutant le sulpiride (10^{-6} M), un antagoniste de la dopamine dépourvu d'affinité pour les sites sigma, en présence de DTG (3×10^{-7} M), l'effet était toujours présent ($K_D = 23,3 \pm 0,2$ nM et le $B_{\max} = 2,07 \pm 0,37$ pmol/mg de protéine). Ce qui démontre que ce ne sont pas les récepteurs de la dopamine qui sont responsables de la modulation du récepteur NMDA mais bien les sites sigma.

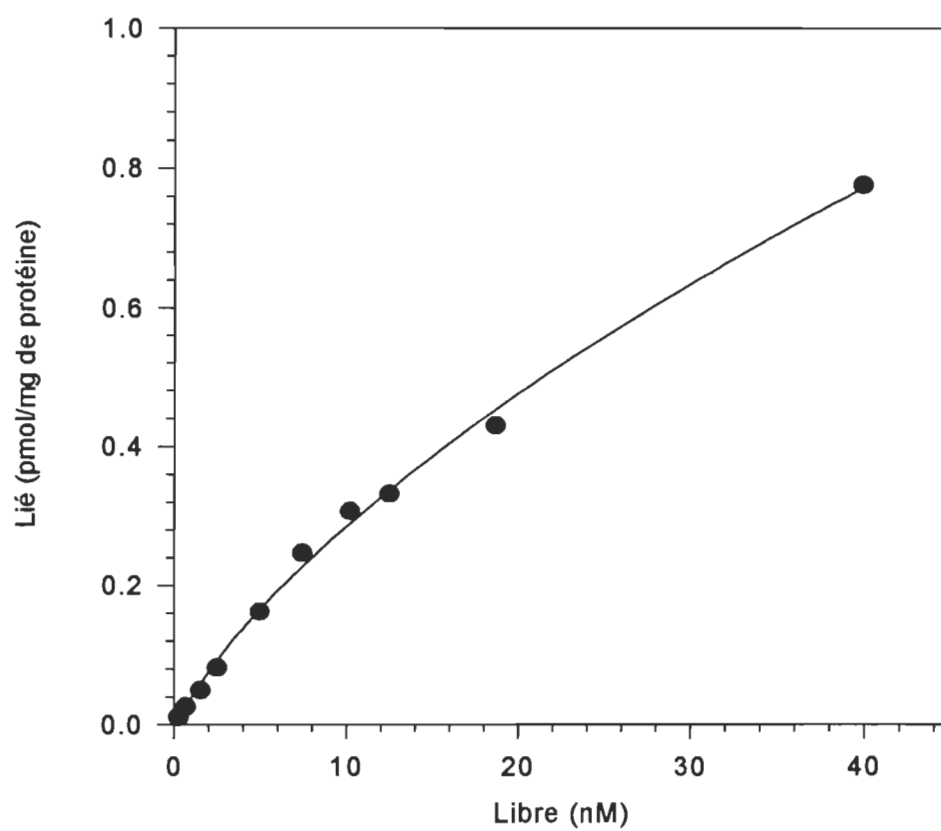


Figure 5. Courbe de saturation de la liaison du $[^3\text{H}]$ MK-801.

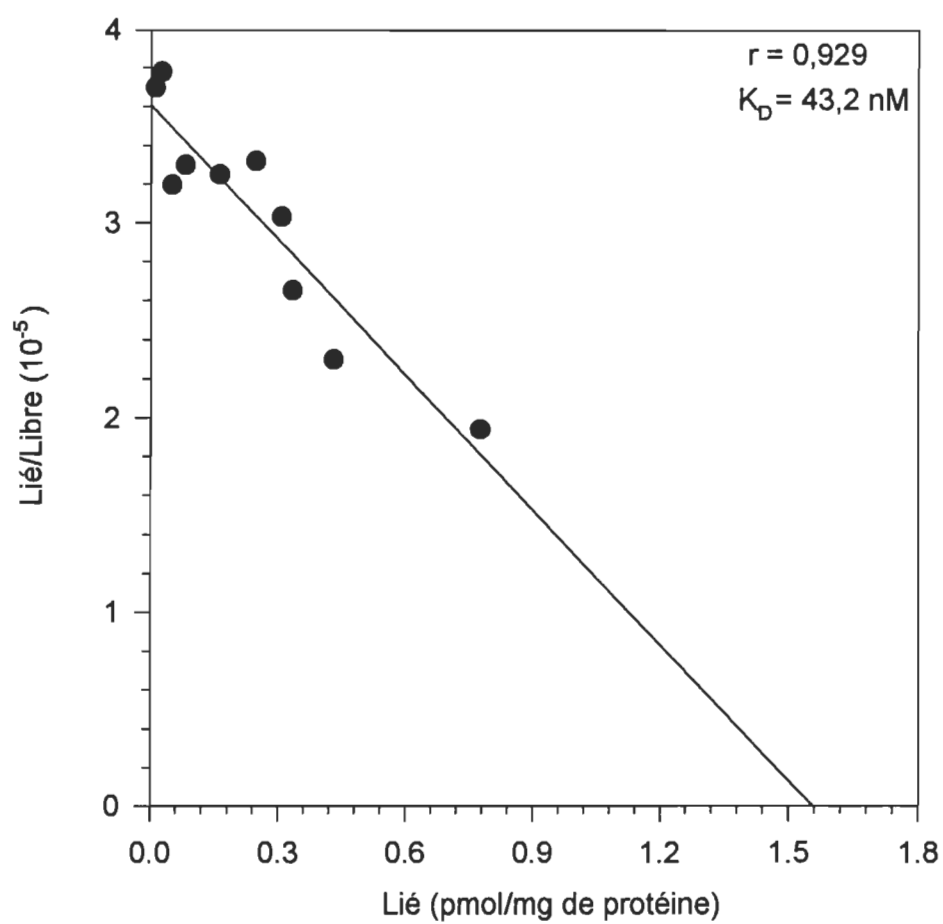


Figure 6. Analyse de Scatchard de la liaison du $[^3\text{H}]\text{MK-801}$.

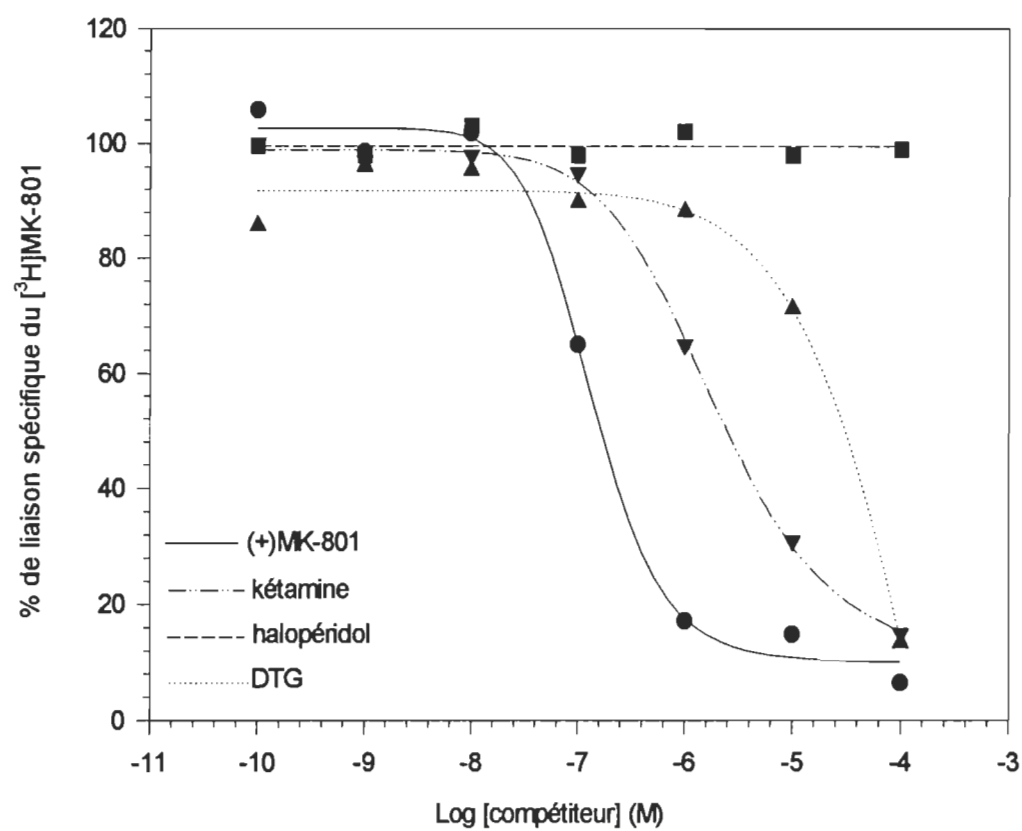


Figure 7. Déplacement dose dépendante de la radioliasion du $[^3\text{H}]\text{MK-801}$.

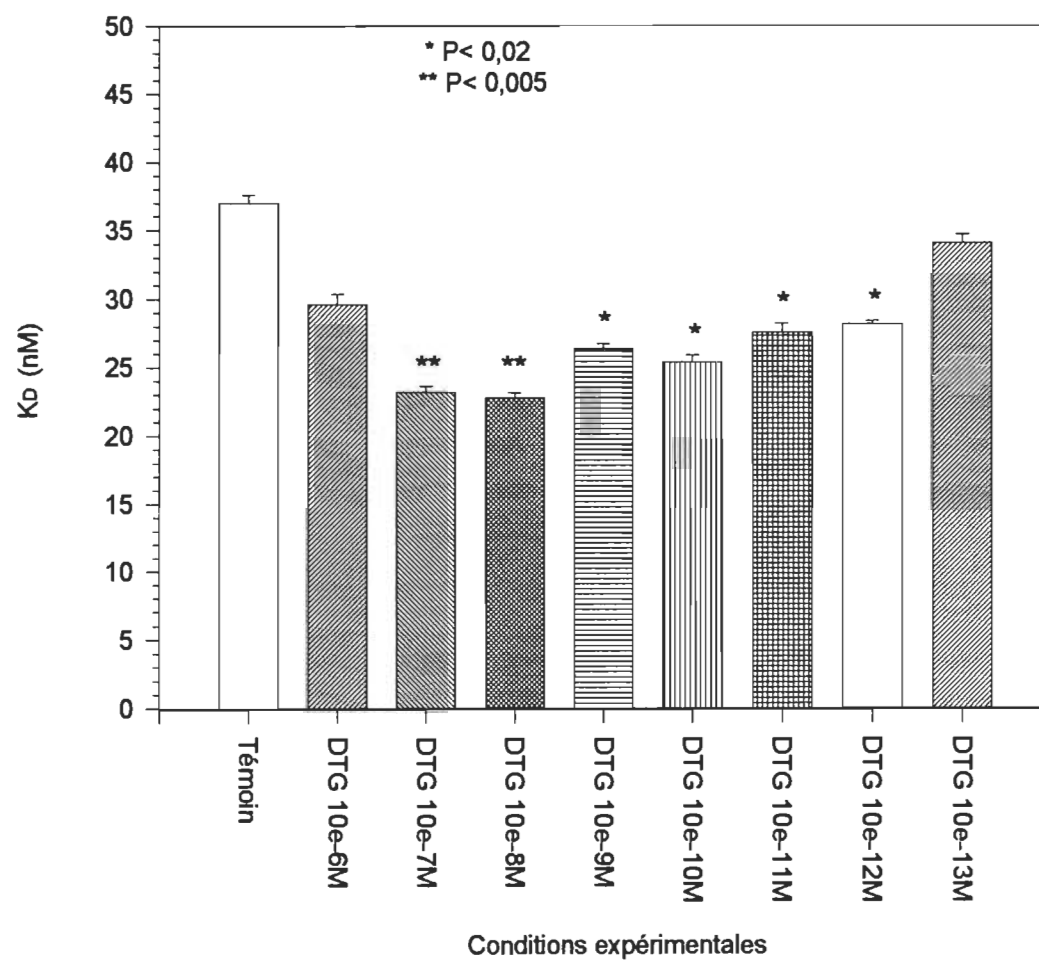


Figure 8. Constante de dissociation du [³H]MK-801 en présence de DTG.

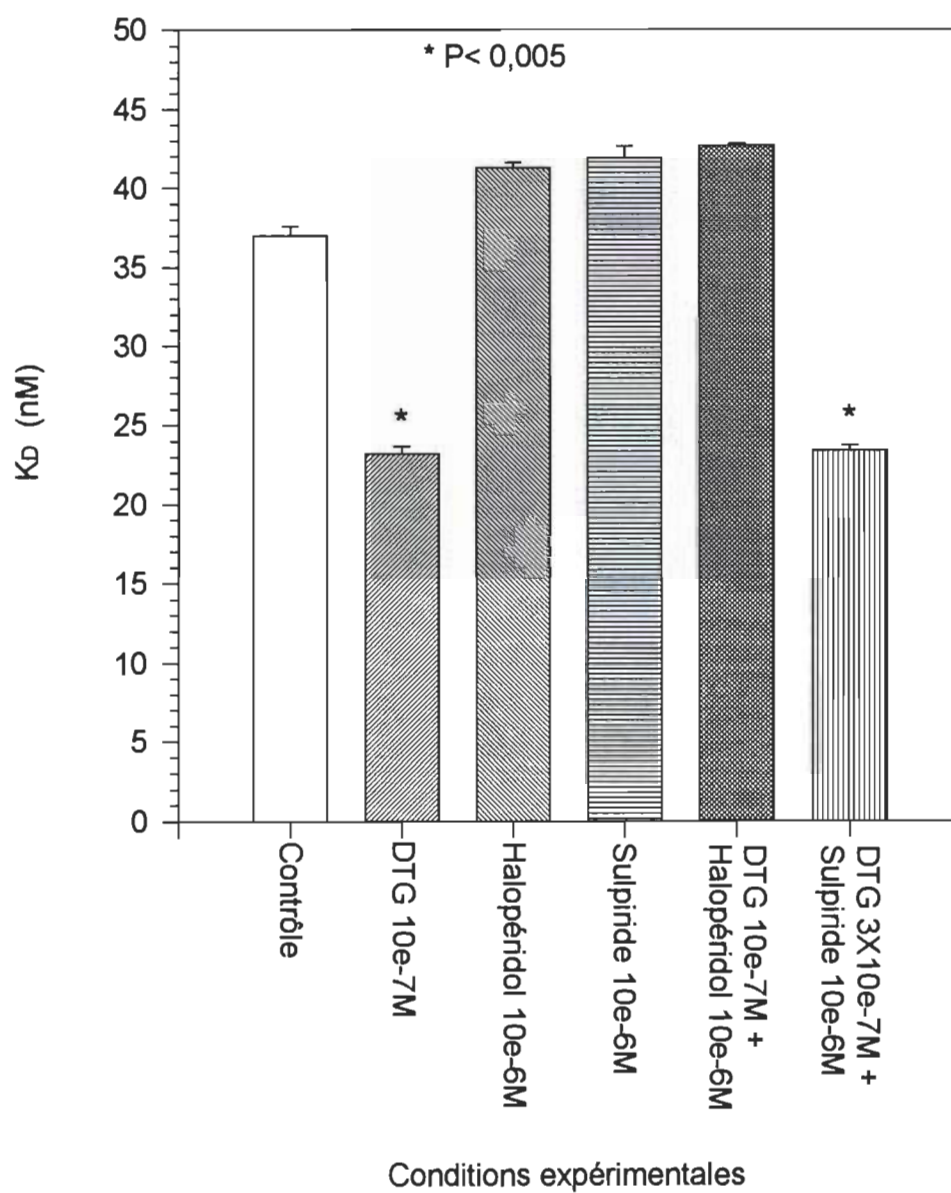


Figure 9. Constante de dissociation du [^3H]MK-801 en présence de DTG et de certains antagonistes dopaminergiques.

3.1.1 Effet de la toxine pertussique

Les résultats obtenus lors de ces expériences nous permettent de mettre en évidence l'interaction des sites sigma avec une protéine G sensible à la toxine pertussique. Toutes nos expériences sont faites en parallèle pour permettre un meilleur contrôle des variances qui peuvent être causées par le manipulateur. Pour permettre l'entrée de cette grosse molécule, qu'est la toxine pertussique, nous avons utilisé la méthode du «freeze/thaw». La technique du «freeze/thaw» décrite dans le chapitre précédent a permis l'introduction de la toxine pertussique, une macromolécule non diffusible, dans les synaptosomes.

Dans les conditions témoins, le [^3H]MK-801 se lie aux préparations synaptosomales avec une constante de dissociation (K_D) de $33,5 \pm 1,8$ nM (moyenne \pm erreur-type). La densité des sites (B_{max}) est de $2,79 \pm 0,58$ pmol/mg de protéine. Comme nous venons de le voir, l'ajout de DTG (100 nM) diminue la constante de dissociation de façon significative à $22,6 \pm 1,7$ nM alors que le nombre de sites de liaison ne varie pas ($2,29 \pm 0,48$ pmol/mg de protéine) (tableau 2).

Tableau 2.

Effet de la toxine pertussique sur les paramètres
de liaison du [^3H]MK-801

Agents pharmacologiques	K_D (nM)	B_{\max} (pmol/mg de protéine)	n
Aucun	$33,5 \pm 1,8$	$2,79 \pm 0,58$	5
DTG (100 nM)	$22,6 \pm 1,7^*$	$2,29 \pm 0,48$	5
Toxine pertussique (100 nM)	$35,0 \pm 1,1$	$2,91 \pm 0,43$	5
Toxine pertussique (100 nM) + DTG (100 nM)	$36,2 \pm 1,2$	$3,01 \pm 0,36$	5

Les valeurs représentent la moyenne \pm erreur-type. * $P < 0,05$ déterminé par un ANOVA (analyse de variance) par comparaison avec la situation témoin, avec DTG, avec toxine pertussique et avec présence de toxine pertussique et de DTG.

L'administration d'une concentration de 100 nM de toxine pertussique n'a aucun effet sur les synaptosomes (tableau 2). En revanche, l'introduction de la toxine pertussique dans les synaptosomes abolit la modulation du récepteur NMDA par le DTG.

Il est intéressant de noter que l'ajout de la toxine pertussique après la procédure de «freeze/thaw» n'a aucun effet sur la modulation de la constante de dissociation du [^3H]MK-801 par le DTG ($K_D = 25,0 \pm 1,2$ nM et le $B_{\text{max}} = 2,54 \pm 0,20$ pmol/mg de protéine). Ainsi, l'introduction de la toxine à l'intérieur des synaptosomes est nécessaire à son action.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons réussi à démontrer pour la première fois une interaction biochimique liant l'activation des sites sigma et la modulation du récepteur NMDA. Nous avons utilisé le [^3H]MK-801, pour marquer le site de la phencyclidine (PCP) du récepteur NMDA (Wong *et coll.*, 1988). La liaison du MK-801 au site PCP inhibe le canal ionique du récepteur NMDA. La liaison du [^3H]MK-801, un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA, est affectée suite à la présence de DTG. Cet effet semble être assuré par une protéine G, car la toxine pertussique bloque l'effet du DTG.

4.1 L'existence de deux états d'activation du récepteur NMDA

Nous avons utilisé ce ligand ([^3H]MK-801) parce qu'il permet d'étudier l'état d'activation du récepteur NMDA. En effet, Javitt & Zukin (1989a) ont montré l'existence de deux différents états d'activation du

récepteur NMDA, selon l'activité des ligands endogènes. Par exemple, ces auteurs ont montré cet effet en analysant les caractéristiques de liaisons du [^3H]MK-801 dans diverses conditions de stimulations des sites NMDA. Ils découvrirent que le [^3H]MK-801 peut se lier à deux états de conformation du complexe récepteur NMDA, correspondant à un état de canal ouvert ou fermé.

Les résultats que Javitt & Zukin (1989a) ont obtenus lors des courbes cinétiques d'association montrèrent que la liaison du [^3H]MK-801 est plus lente en absence qu'en présence des agonistes du récepteur NMDA. En particulier, ils ont démontré en effectuant des courbes de dissociation, en présence de glutamate, que le temps de demi-dissociation ($t_{1/2}$) est de 18 minutes comparativement au temps obtenu en absence de glutamate qui varie entre 70 et 180 minutes. Ces résultats ont amené les auteurs à suggérer qu'en absence d'agonistes du récepteur NMDA le canal associé à ce récepteur est fermé, surtout dans un état d'inactivation. À l'opposé, en présence d'agonistes du récepteur NMDA, le radioligand atteindrait son site plus rapidement étant donné que le canal est dans un état d'activation (ou ouvert). En fait, lorsqu'il y a présence de glutamate, l'affinité du MK-801 pour le site PCP est augmentée, par contre en absence du glutamate l'affinité du MK-801 est diminuée.

Nous pourrions attribuer que les changements de liaisons pour le [³H]MK-801 en présence de ligands sigma par une simple modification dans la proportion des canaux NMDA qui sont dans un état d'activation. Toutefois, Javitt & Zukin (1989a) ont clairement démontré que les valeurs d'affinité pour le site PCP ne peuvent être affectés que par une modification du niveau d'activation par le glutamate et la glycine. Nos changements de K_D pour le [³H]MK-801 générés par les ligands sigma sont fort probablement le résultat d'une perturbation même des sites PCP plutôt qu'une altération de l'activité du canal NMDA. D'autres expériences seront nécessaires pour vérifier les effets des ligands sigma sur la proportion des récepteurs NMDA que l'on retrouve en état d'activation ou de désactivation.

Il est de plus important de mentionner que pour le récepteur NMDA il existe deux familles distinctes de sous-unités protéiques (NMDAR1, NMDAR2) qui ont été identifiées grâce aux diverses techniques de clonage moléculaire. Pour le moment, nous ne sommes pas capables de distinguer quelles familles de sous-unités protéiques du récepteur NMDA peuvent être préférentiellement modulées par les sites sigma.

4.2 L'interaction entre le site sigma et le récepteur NMDA

Une portion importante de la présente étude consistait à préciser la nature biochimique de l'augmentation de l'affinité du site PCP pour le MK-801 induite par les ligands sigma. Le 1,3-di(2-tolyl)-guanidine (DTG) est un agent psychotrope qui se lie aux sites sigma (Weber *et coll.*, 1986). Le traitement des synaptosomes avec une concentration très faible de DTG (100 nM), concentration 1800 fois inférieure à l'IC₅₀ du récepteur NMDA, provoque une diminution de la K_D de ses récepteurs pour le [³H]MK-801 sans modifier la densité des récepteurs (figure 8).

La courbe de compétition du DTG (figure 7) nous montre que le DTG est un faible inhibiteur du site PCP. Nous pouvons remarquer qu'à une concentration plus faible que 10 µM, le DTG ne déplace plus le [³H]MK-801. L'effet maximal du DTG sur la K_D du [³H]MK-801 a lieu à la concentration de 10 nM (P<0,005). Lorsque nous diminuons la concentration du DTG, la K_D augmente ce qui nous indique que l'interaction du DTG avec les sites sigma devient de plus en plus négligeable, par conséquent, l'affinité du [³H]MK-801 pour le site PCP revient vers la valeur témoin.

L'halopéridol dont les propriétés d'antagoniste dopaminergique D_2 sont bien connues se lie avec beaucoup d'affinité aux sites sigma (Ferris *et coll.*, 1991). L'ajout préalable d'halopéridol aux préparations synaptosomales abolit l'effet du DTG, si bien que la K_D revient à la valeur témoin (figure 9). En revanche, le sulpiride (1 μ M), un autre antagoniste des récepteurs D_2 dopaminergiques qui n'a aucune affinité pour les sites sigma, n'inhibe pas l'effet du DTG sur la K_D du [3 H]MK-801 (figure 9). Ceci montre que les récepteurs D_2 dopaminergiques ne sont pas responsables de l'effet de l'halopéridol. L'halopéridol et le sulpiride n'affectent pas la liaison du [3 H]MK-801 quand ils sont utilisés seuls (figures 8 et 9).

Nous pouvons remarquer une augmentation de l'affinité du [3 H]MK-801 au site PCP du récepteur NMDA en présence de DTG. Le site PCP devient plus accessible pour le radioligand. Nous pouvons avancer deux hypothèses pour expliquer l'effet modulateur : une modulation allostérique ou une modulation covalente. La modulation allostérique exige la liaison d'une molécule modulatrice. Par contre, la modulation covalente, modifie l'activité en changeant la conformation de la protéine en ajoutant un groupement chimique (le plus souvent un groupement phosphate).

Si nous appliquons cette théorie à nos expériences : la modulation allostérique exige la liaison d'une molécule modulatrice qui serait libérée lorsque le DTG se lie au site sigma. Cette molécule modulatrice aurait un site de liaison sur le récepteur NMDA et modifierait de façon allostérique le site de liaison du [^3H]MK-801 sur le récepteur NMDA de manière à augmenter l'affinité du [^3H]MK-801 pour le site PCP.

Nous rejetons l'hypothèse de la modulation allostérique parce que nous lavons les préparations par centrifugation suite à la période d'incubation. Cela permet d'éliminer une grande partie des traces d'agents pharmacologiques. Nous pensons que c'est l'hypothèse de la modulation covalente qui agit dans notre cas. De plus, l'effet du DTG persiste après le lavage des préparations par centrifugation. Par ailleurs, Brent *et coll.* (1995) suggèrent que les ligands sigma produisent leurs effets biologiques par l'intermédiaire de la phosphorylation des protéines.

Monnet *et coll.* (1990, 1992) ont démontré en électrophysiologie, sur des rats qui ont reçu une injections i.v. de DTG, une augmentation de l'activité du récepteur NMDA. Le DTG traverse la barrière hémato-encéphalique, par conséquent, ils ne pouvaient pas évaluer la concentration finale de DTG qu'il y a dans le cerveau. D'autres chercheurs (Fletcher *et coll.*, 1993 ; Malouf *et*

coll. 1988) n'ont observé aucune interaction entre les sites sigma et les récepteurs NMDA en présence de DTG. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces derniers chercheurs utilisent des méthodes qui diffèrent de ceux utilisées par Monnet *et coll.* (1990, 1992). Nous avons montré qu'en ajoutant du DTG, nous diminuons la K_D , s'il y a diminution de la K_D il y a une augmentation de l'affinité du [^3H]MK-801 pour le site PCP. Le site PCP du récepteur NMDA devient plus accessible au [^3H]MK-801 par l'intermédiaire, nous pensons, d'une phosphate ou une kinase qui viendrait peut-être moduler le récepteur NMDA. De la sorte, nos résultats appuient ceux obtenus par Monnet *et coll.* (1990, 1992), qui observent une augmentation de l'activité du récepteur NMDA en ajoutant du DTG.

4.3 Effet de la toxine pertussique

Plusieurs chercheurs ont rapporté que le site sigma serait couplé à une protéine G (Beart *et coll.*, 1989 ; Connick *et coll.*, 1992 ; Itzhak & Khouri, 1988 ; Itzhak, 1989). Itzhak & Khouri (1988) ont montré que la liaison du (+)SKF-10047 et, de façon moins évidente, le GTP et le 5'-guanilylimidodiphosphate (Gpp(NH)p) diminuent la liaison du [^3H](+)-3-PPP, sur des membranes de rat. De plus, le déplacement du [^3H](+)-3-PPP par le

(+)-SKF-10047 est biphasique, avec 40% des sites de liaison du [3 H](+)-3-PPP qui ont une haute affinité pour le (+)-SKF-10047. Le Gpp(NH)p (analogue non hydrolysable du GTP) élimine la composante de haute affinité du déplacement, produisant ainsi des courbes monophasiques. Ceci suggère la déstabilisation d'un état de haute affinité des sites de liaisons du [3 H](+)-3-PPP par le nucléotide guanylique. Beart *et coll.* (1989) ont aussi montré que le GTP diminue la liaison du [3 H](+)-3-PPP sur des préparations de membranes faites à partir de cortex de cochon d'Inde. Itzhak (1989) a montré sur des préparations de membranes de rat que la toxine pertussique et le *N*-éthylmaléimide (NEM) diminuent la liaison du [3 H](+)-3-PPP. Il a suggéré que le traitement avec le Gpp(NH)p, le NEM et la toxine pertussique agissent tous sur la même cible pour affecter la liaison du [3 H](+)-3-PPP.

Nous avons décidé d'investiguer les effets de la toxine pertussique. Cette toxine inactive certaines protéine G, particulièrement les protéines G de type G_i et G_o et peut-être même d'autres types de protéines G. En présence de toxine pertussique (100 nM), on note une perte totale de la modulation de l'affinité de la liaison du [3 H]MK-801 au site PCP du récepteur NMDA après traitement des synaptosomes en suspension avec le DTG (100 nM). Cette inhibition de la modulation du DTG par la toxine pertussique démontre bien l'intervention d'une protéine G sensible à cette

toxine. Si on ajoute la toxine pertussique après la technique de «freeze/thaw», nous n'obtenons pas d'effet. Cela montre que l'effet est bien intracellulaire.

4.4 Mécanismes de transduction des sites sigma

À ce jour, il y a peu de connaissance dans la littérature en ce qui concerne les seconds messagers associés aux sites sigma. Comme nous l'avons décrit auparavant, des études de radiolisation et notre étude ont montré que certains sites sigma sont couplés à une protéine G (Beart *et coll.*, 1989 ; Connick *et coll.*, 1992 ; Itzhak & Khouiri, 1988 ; Itzhak, 1989).

Des données récentes suggèrent que les ligands sigma produisent leurs effets biologiques par l'intermédiaire de la phosphorylation des protéines (Brent *et coll.*, 1995). Le traitement avec des ligands sigma sélectifs sur des préparations synaptosomales isolées à partir du cortex de rat a produit une augmentation du niveau de base de phosphorylation de la synapsine I (qui module la libération des neurotransmetteurs) et une augmentation dose dépendante de la phosphorylation de la dynamine (qui module le recyclage des vésicules) (Brent *et coll.*, 1995). Cela suggère pour la première fois, que la

phosphorylation des protéines pourrait être un mécanisme par lequel les agonistes sigma produisent leurs effets biologiques.

La phosphorylation des protéines représente un des plus importants mécanismes moléculaires par lequel les signaux extracellulaires produisent leurs effets biologiques. La phosphorylation des protéines des canaux ioniques régulé par un ligand semble être le principal mécanisme pour la régulation de l'efficacité synaptique. Dans notre modèle, nous pouvons postuler qu'un mécanisme de phosphorylation des protéines entre en jeu. Nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : que la modulation de l'affinité du [³H]MK-801 par les sites sigma s'exercerait, par l'intermédiaire de la phosphorylation du récepteur NMDA via un mécanisme sensible à la toxine pertussique.

En fait, des expériences récentes faites sur des densités postsynaptiques de cerveau de rat suggèrent que la protéine kinase C et la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II induisent la phosphorylation du récepteur/canal NMDA et entraînent ainsi une augmentation de l'entrée des ions de Ca^{2+} à travers le canal (Kitamura *et coll.*, 1993). Ces résultats pourraient expliquer les données que nous avons obtenues sur la modulation du [³H]MK-801 et les résultats obtenus par Monnet *et coll.* (1990, 1992) sur l'augmentation de la réponse du récepteur NMDA

observée durant l'enregistrement électrophysiologique des neurones de l'hippocampe après l'administration de DTG. Le récepteur NMDA pourrait varier entre des états phosphorylés et déphosphorylés selon que les sites sigma sont activés ou non. Nous pouvons donc postuler que la modulation de la liaison du [³H]MK-801 par le DTG pourrait bien être dû à la phosphorylation des récepteurs NMDA induite par l'activation des sites sigma.

Par contre, il convient de noter que les concentrations de ligands sigma utilisées par Brent *et coll.* (1995) sont très élevées (100 µM). Dans ces conditions, tous les ligands sigma agissent comme des agonistes (Brent *et coll.*, 1995). Pour nous, Monnet *et coll.* (1990, 1992) et Debonnel *et coll.* (1990), certains ligands sigma agissent comme agonistes (p. ex., le DTG) et d'autres comme antagonistes (p. ex., l'halopéridol). L'affinité de l'halopéridol pour les sites sigma est de 4 nM (Walker *et coll.*, 1988). Il se peut, par le fait, que Brent *et coll.* (1995) utilisent des concentrations très élevées de ligands sigma, que ces ligands ne passent plus par les sites sigma, mais bien par d'autres voies d'interaction.

4.5 L'hypothèse de la schizophrénie

L'hypothèse de la dopamine constitue l'explication la plus généralement admise de la schizophrénie. Elle postule que l'augmentation de la transmission dopaminergique provoque, du moins en partie, les symptômes de la maladie. Le fait que les agents pharmacologiques influençant les symptômes de la schizophrénie agissent au niveau des synapses dopaminergiques supporte cette hypothèse. Ainsi, les agonistes dopaminergiques, comme les agents pharmacologiques qui ressemblent aux amphétamines, aggravent les symptômes. Par ailleurs, les médicaments neuroleptiques typiques utilisés dans le traitement de la schizophrénie sont des inhibiteurs des récepteurs dopaminergiques de type D₂. Cette hypothèse qui met en jeu la dopamine n'explique pas tous les phénomènes qui surviennent dans la schizophrénie.

D'autres données suggèrent que des désordres dans les systèmes de transmission autres que la dopamine pourraient aussi contribuer à la schizophrénie. Ainsi, la phencyclidine produit une psychose qui ressemble beaucoup aux symptômes de la schizophrénie (Halberstadt, 1995). Des sujets normaux qui ont reçu une injection i.v. de phencyclidine ont souvent ressenti une sensation de dépersonnalisation et une perte de contact avec

la réalité (Roberts, 1990). Ils ont aussi le sentiment d'être contrôlés par des agents externes et ont des hallucinations auditives et menaçantes.

La phencyclidine interagit avec plusieurs sites spécifiques dans le cerveau, notamment le récepteur NMDA et les sites sigma. La phencyclidine agit aussi comme un inhibiteur de la recapture de la dopamine (Krebs *et coll.*, 1991). La phencyclidine produit des effets qui sont similaires à ceux que produisent les agonistes de la dopamine comme l'amphétamine et l'apomorphine (Bristow *et coll.*, 1994). L'autre hypothèse de la schizophrénie propose que, lorsqu'il y a un déséquilibre dans les synapses glutamatergiques, l'augmentation de l'activation du récepteur NMDA pourrait produire une augmentation de la libération de dopamine (Gonzalez-Alvear *et coll.*, 1994). Cette anomalie peut se rétablir en créant un renforcement de la neurotransmission du NMDA (p. ex., en activant le site de la glycine du récepteur NMDA). L'activation du site de la glycine devrait donc exercer une activité antipsychotique.

En fait, chez certains schizophrènes du moins, on trouve aussi des anomalies des systèmes glutamatergiques, lesquels sont étroitement reliés aux systèmes dopaminergiques, ainsi que des taux de sérotonine (Halberstadt, 1995). Dans les cerveaux postmortem des schizophrènes, les

anomalies du système glutamatergique comprennent une diminution (jusqu'à 50%) du niveau de glutamate et une diminution de la liaison de l'acide kaïnate dans le lobe temporal médian (Halberstadt, 1995). Il est important de noter que les mécanismes glutamatergiques exercent une influence majeure sur le développement du lobe temporal médian, et c'est une partie du cerveau qui fonctionne anormalement chez les individus schizophrènes (Halberstadt, 1995). La diminution de la neurotransmission glutamatergique pourrait être responsable de la physiopathologie du comportement schizophrénique.

Nous pouvons spéculer, à la lumière de nos observations que l'administration à des schizophrènes des neuroleptiques agit sur les sites sigma et est capable de réduire la transmission dopaminergique et ce par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs NMDA. L'observation que l'halopéridol est capable d'empêcher les changements d'affinité du site PCP produit par les ligands sigma vont à l'opposé de cette interprétation. Nos données laissent plutôt supposer que les neuroleptiques, comme l'halopéridol, possèdent des effets antipsychotiques indépendant du système glutamatergique. Toutefois, des études récentes effectuées par Brent *et coll.* (1995) ont permis de démontrer que de fortes doses d'halopéridol génèrent une hausse de l'affinité du site PCP tout comme

celle observée lors de la stimulation des sites sigma par un agoniste. Nous proposons que les neuroleptiques peuvent posséder des effets amplificateurs ou inhibiteurs de la fonction glutamatergique dépendamment de la concentration du psychotrope utilisée. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'un rôle crucial de la fonction glutamatergique dans la schizophrénie.

Comme mentionné auparavant, les antagonistes dopaminergiques, tel que l'halopéridol, agissent comme des neuroleptiques puissants. La question que nous pouvons poser est la suivante : comment l'action d'un antagoniste dopaminergique peut entrer dans la théorie glutamatergique de la schizophrénie? Puisque, les médicaments neuroleptiques ne réagissent pas directement avec les récepteurs glutamatergiques, ils exercent probablement une action indirecte sur des récepteurs glutamatergiques. Ceci met en jeu les sites sigma, qui lient certains neuroleptiques, parce que ces derniers sites modulent le récepteur glutamatergique NMDA.

Malgré l'occupation presque immédiate des récepteurs dopaminergiques par les médicaments neuroleptiques, on observe souvent un délai d'une à deux semaines avant l'apparition de l'effet thérapeutique maximal. Cela semble indiquer que l'inhibition de la transmission

dopaminergique ne soit pas liée aux effets cliniques. L'action antipsychotique pourrait être secondaire à d'autres effets dans le cerveau qui ont lieu sur plusieurs semaines.

Nous observons un effet immédiat de l'halopéridol sur nos préparations synaptosomales. Alors que chez les schizophrènes, les neuroleptiques ont besoin d'une administration à long terme pour manifester leurs effets. Ainsi, une régulation homéostatique, cherchant à compenser les effets manifestés à court terme, pourrait apparaître à long terme et être responsable des effets thérapeutiques.

4.6 Perspectives

Dans le cadre de la poursuite de ce projet au niveau du doctorat, nous prévoyons investiguer les systèmes de transduction qui impliquent une protéine G et des protéines kinases entre le site sigma et le récepteur NMDA. L'analyse des données obtenues avec le [³H]MK-801 montrent une modulation du récepteur NMDA par l'intermédiaire des sites sigma. Nous savons aussi qu'une protéine G sensible à la toxine pertussique intervient lors de la modulation biochimique du récepteur NMDA.

Il nous reste à faire des expériences pour déterminer si cette protéine G est aussi sensible à la toxine cholérique. Ainsi, si la protéine G est sensible à la toxine cholérique, celle-ci activera directement des protéines G_s . Nous n'ajouterons pas de DTG à la préparation de synaptosomes contenant la toxine cholérique. Si nous obtenons une réponse, cela indique qu'il existe un ou plusieurs mécanismes qui utilisent une protéine G sensible à la toxine cholérique.

Dans les densités postsynaptiques, la phosphorylation du récepteur/canal NMDA par la protéine kinase C ou par la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II entraîne une augmentation de l'entrée de Ca^{2+} à travers le canal (Kitamura *et coll.*, 1993). Brent *et coll.* (1995) ont observé que des ligands sigma augmentent la phosphorylation de la synapsine I et de la dynamine dans les synaptosomes préparés à partir du cerveau antérieur de rat. En analysant tous ces résultats, nous pouvons émettre une hypothèse. Cette hypothèse consisterait à montrer que les sites sigma phosphoryleraient le récepteur NMDA par l'intermédiaire des kinases.

Nous voulons voir si l'effet de modulation du récepteur NMDA sera présent en présence d'inhibiteurs des protéines kinases candidates. Si la

protéine kinase C est impliquée, nous pouvons inhiber cette protéine avec le H-7 et si la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II est impliquée, nous pouvons l'inhiber avec le KN-62. Puis si nous ajoutons du DTG dans les deux cas et que nous n'avons pas de modulation au niveau du récepteur NMDA, nous savons alors que ces deux protéines kinases interviennent. Une fois que nous avons vu l'effet des inhibiteurs mentionnés, nous pouvons essayer de montrer l'effet en utilisant des activateurs de ces kinases. Si nous inhibons la protéine kinase C avec le H-7, nous pouvons activer directement la protéine kinase C avec un ester de phorbol.

Pour faire entrer ces grosses molécules (toxine cholérique, H-7 et KN-62), nous utiliserons la technique du «freeze/thaw» (Nichols *et coll.*, 1989) qui a été décrite dans le chapitre des matériels et méthodes expérimentales.

Il sera important pour nous d'effectuer une quantification des phosphoprotéines en utilisant des méthodes immunologiques. Ainsi, pour étudier ce phénomène nous ferons une séparation des phosphoprotéines en utilisant l'électrophorèse sur gel.

CONCLUSION

Les résultats obtenus avec les synaptosomes et le [³H]MK-801 démontrent que l'activation des sites sigma augmente l'affinité de ce radioligand pour le site de la phencyclidine (PCP) des récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA). Il est aussi important de noter que l'halopéridol inhibe cette modulation. Cela nous porte à croire qu'il existe des récepteurs NMDA et des sites sigma sur les mêmes neurones corticaux. La toxine pertussique abolit l'effet du 1,3-di(2-tolyl)-guanidine (DTG) sur les préparations de synaptosomes, ce qui suggère l'intervention d'une protéine G. Cette étude nous permet aussi de distinguer la nature, agoniste ou antagoniste, des ligands sigma en se basant sur l'effet qu'ils exercent sur la K_D du [³H]MK-801.

Brent *et coll.* (1995) suggèrent que les ligands sigma pourraient produire leurs effets biologiques par suite d'une phosphorylation des protéines. Ces données et les résultats que nous avons obtenus avec la toxine pertussique viennent appuyer nos résultats qui suggèrent l'intervention d'une protéine G.

Dans les études futures, nous prévoyons mettre en évidence l'existence des kinases impliquées dans la phosphorylation du récepteur NMDA.

RÉFÉRENCES

- Ascher, P. & Nowak, L. (1988). Quisqualate and kainate-activated channel in mouse central neurons in culture., *Journal of Physiology (London)*, 399, 227-245.
- Barnard, E.A. & Henley, J.M. (1990). The non-NMDA receptors: types, protein structure and molecular biology., *Trends in Pharmacological Sciences*, 11, 500-507.
- Beart, P.M., O'Shea, R.D. & Manallack, D.T. (1989). Regulation of sigma receptors: high and low affinity agonist states, GTP shifts, and up-regulation by rimcazole and DTG., *Journal of Neurochemistry*, 53, 779-788.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brent, P.J., Haynes, H., Jarvie, P.E., Mudge, L., Sim, A.T.R. & Dunkley, P.R. (1995). Phosphorylation of synapsin I and dynamin in rat forebrain synaptosomes : modulation by sigma ligands., *Neuroscience Letters*, 191,1-2.
- Bristow, L.J., Thorn, L., Tricklebank, M.D. & Huston, P.H. (1994). Competition NMDA receptor antagonists attenuate the behavioural and neurochemical effects of amphetamine in mice., *European Journal of Pharmacology*, 264, 353-359.

- Chavkin, C. (1990). The sigma enigma: Biochemical and functional correlates emerge for the haloperidol sensitive sigma binding site., *Trends in Pharmacological Sciences*, 11, 213-215.
- Cheng, Y.C. & Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (CI_{50}) of an enzymatic reaction., *Biochemical Pharmacology*, 22, 3099-3108.
- Connick, J.H., Hanlon, G., France, L., Fox, P.K. & Nicholson, C.D. (1992). G-protein modulation of 1,3-di-o-tolylguanidine (DTG binding). In Kamenka, J.-M. & Domino, E.F. (Éds), *Multiple Sigma and PCP receptors ligands: Mechanisms for neuromodulation and neuroprotection?* (pp. 193-200). Annual Arbor, NPP Books.
- Debonnel, G., Monnet, F.-P. & de Montigny, C. (1990). Further evidence for the modulation of the excitatory effect of NMDA by sigma receptor ligands., *FASEB Journal*, 4, A330.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J. & Rostas, J.A.P. (1986) A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients., *Brain Research*, 372, 115-129.
- Ferris, C.D., Hirsch, D.J., Brooks, B.P. & Snyder, S.H. (1991). σ receptors: from molecule to man., *Journal of Neurochemistry*, 57, 729-737.
- Ferris, R.M., Tang, F.L.M., Chang, K.-J. & Russell, A. (1986). Evidence that the potential antipsychotic agent rimocazole (BW 234U) is a specific, competitive antagonist of sigma sites in brain., *Life Sciences*, 38, 2329-2337.
- Fletcher, E.J., Church J., Abdel-Hamid K. & MacDonald, J.F. (1993). Selective reduction of *N*-methyl-D-aspartate responses by 1,3-di(2-tolyl)guanidine in mouse and rat cultured hippocampal pyramidal neurones., *British Journal of Pharmacology*, 109, 1196-1205.

- Gonzalez-Alvear, G.M. & Werling, L.L. (1994). Regulation of [³H]dopamine release from rat striatal slices by sigma receptor ligands., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271, 212-219.
- Halberstadt, A.L. (1995). The phencyclidine-glutamate model of schizophrenia., *Clinical Neuropharmacology*, 18, 237-249.
- Hashimoto, K. & London, E.D. (1993). Further evidence of [³H]ifenprodil binding to sigma receptors in rat brain., *European Journal of Pharmacology*, 236, 159-163.
- Itzhak, Y. (1988). Multiple affinity binding states of the sigma receptor: Effect of GTP-binding protein-modifying agents., *Molecular Pharmacology*, 36, 512-517.
- Javitt, D.C. & Zukin, S.R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia., *American Journal of Psychiatry*, 148, 1301-1308.
- Javitt, D.C. & Zukin, S.R. (1989a). Interaction of [³H]MK-801 with multiple states of the NMDA receptor complex of the rat brain., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86, 740-744.
- Javitt, D.C. & Zukin, S.R. (1989b). Biexponential kinetics of [³H]MK-801 binding: evidence for access to closed and open *N*-methyl-D-aspartate receptor channels., *Molecular Pharmacology*, 35, 387-393.
- Kemp, J.A. & Leeson, P.D. (1993). The glycine site of the NMDA receptor - five years on., *Trends in Pharmacological Sciences*, 14, 20-25.
- Kenakin, T.P., Bond, R.A., Bonner, T.I. (1992). II. Definition of pharmacological receptors., *Pharmacological Reviews*, 44, 351-362.

- Kitamura, Y., Miyazaki, Y. Yamanaka, Y. & Nomura, Y. (1993). Stimulatory effects of protein kinase C and calmodulin kinase II on *N*-methyl-D-aspartate receptor/channels in the postsynaptic density of rat brain., *Journal of Neurochemistry*, 61, 100-109.
- Kleckner N.W. & Dingledine R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes., *Science*, 241, 835-837.
- Klein, M. & Musacchio, J. (1989). High affinity dextromethorphan binding sites in guinea pig brain, effect of sigma ligands and other agents., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 251, 207-215.
- Klotz, I.M. (1982). Numbers of receptors sites from Scatchards graphs : facts and fantasies., *Science* , 217, 1247-1249.
- Krebs, M.O., Desce, J.M., Kemel, M.L., Gauchy, C., Godeheu, G., Cheramy, A. & Glowinski, J. (1991). Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: Evidence for presynaptic *N*-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals., *Journal of Neurochemistry*, 50, 81-85.
- Kushner, L., Lerma, J., Zukin, R. & Bennett, M. (1988). Coexpression of *N*-methyl-D-aspartate and phencyclidine receptor in *Xenopus* oocytes with rat brain mRNA., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85, 3320-3254.
- Largent, B.L., Wikström, H., Snowman, A.H. & Snyder, S.H. (1988). Novel antipsychotic drugs share high affinity for σ receptors., *European Journal of Pharmacology*, 155, 345-347.

- Largent, B., Gundlach, A. & Snyder, S. (1986). Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in rat brain with (+)-[³H]SKF-10,047, (+)-[³H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl) piperidine and [³H]-1-[1-(2-thienyl) cyclohexyl] piperidine., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 238, 739-748.
- Lesage, A.S. De Loore, K.L, Peeters, L. & Leysen, J.E. (1995). Neuroprotective sigma ligands interfere with the glutamate-activated NOS pathway in hippocampal cell culture., *Synapse*, 20, 156-164.
- Malouf, A.T., Swearengen, E. & Chavkin, C. (1988). Comparison of the actions of phencyclidine and sigma ligands on CA1 hippocampal pyramidal neurons in the rat., *Neuropharmacology*, 27, 1161-1170.
- Marivon, J.-C. & Baudry, M. (1994). [³H]Dizocilpine association kinetics distinguish stimulatory and inhibitory polyamine sites of N-methyl-D-aspartate receptors., *Journal of Neurochemistry*, 63, 963-971.
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E. & Gilbert, P.E. (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 197, 517-532.
- Matsumoto, R., Hemstreet, M., Lai, N., Thurkauf, A., de Costa, B., Rice, K., Hellewell, S.B., Bowen, W.D. & Walker, J.M. (1990). Drug specificity of pharmacology dystonia., *Pharmacological and Biochemical Behaviour*, 36, 151-155.
- McPherson, G.A. (1983). A practical computer-based approach to the analysis of radioligand binding experiments., *Computer Programs Biomedical*, 17, 107-114.

- Monnet, F.P., Debonnel, G. & De Montigny, C. (1992). *In vivo* electrophysiological evidence for a selective modulation of *N*-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation in rat CA₃ dorsal hippocampus by *sigma* ligands., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261, 123-130.
- Monnet, F.P., Debonnel, G., Junien, J.L. & De Montigny, C. (1990). *N*-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by σ receptors., *European Journal of Pharmacology*, 179, 441-445.
- Musacchio, J., Klein, M. & Canoll, P. (1989). Dextromethorphan and sigma ligands: common sites but diverse effects., *Life Sciences*, 45, 1721-1732.
- Musacchio, J. & Klein, M. (1988). Dextromethorphan binding sites in the guinea pig brain., *Cellular and Molecular Neurobiology*, 8, 149-156.
- Nawy, S & Jahr, C.E. (1990). Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells., *Nature*, 346, 269-271.
- Nichols, R.A., Wilson, C.-S.W., Haycock, J.W. & Greengard, P. (1989). Introduction of impermeant molecules into synaptosomes using freeze/thaw permeabilization., *Journal of Neurochemistry*, 52, 521-529.
- Ofri, D., Fan, L.Q., Simon, E.J. & Hiller, J.M. (1992). Lesioning of the nucleus basalis of Meynert has differential effects on mu, delta, and kappa opioid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study., *Brain Research*, 581, 252-260
- Patneau, D. & Mayer, M.L. (1990). Structure activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at *N*-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors., *The Journal of Neuroscience*, 10, 2385-2399.

- Quirion, R., Bowen, W.D., Itzhak, Y., Junien, J.L., Musacchio, J.M., Rothman, R.B., Su, T.-P., Tam, W. & Taylor, D.C. (1992). A proposal for the classification of sigma binding sites., *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 85-86.
- Quirion, R., Chicheportiche, R., Contreras, P.C., Jonhson, K., Lodge, D., Tam, S.W., Woods, J.H. & Zukin, S.R. (1987). Classification and nomenclature of phencyclidine and sigma receptor sites., *Trends in Neurosciences*, 10, 444-446.
- Rao, T.S., Mick, S.J., Cler, J.A., Emmett, M.R., Dilworth, V.M., Contreras, P.C., Gray, N.M., Wood, P.L. & Iyengar, S. (1991). Effects of sigma ligands on mouse cerebellar cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels *in vivo*: further evidence for a functional modulation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex-mediated events by sigma ligands., *Brain Research*, 561, 43-50.
- Roberts, G.W. (1990). Schizophrenia: the cellular biology of a functional psychoses., *Trends in Neurosciences*, 13, 207-211.
- Rothman, R., Reid, A., Mahboubi, A., Kim, C.-H., de Costa, B., Jacobson, A. & Rice, K. (1991). Labeling by [³H]1,3-DTG of two high affinity binding sites in guinea pig brain: allosteric regulation by Ca channel antagonists and pseudoallosteric modulation by σ ligands., *Molecular Pharmacology*, 39, 222-232.
- Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions., *Annual New York Academy of Science*, 51, 660-672.
- Sircar, R., Nichtenhauser, R., Ieni, J. & Zukin, S. (1986). Characterization and autoradiographic visualization of (+)-[³H]SKF10,047 binding in rat and mouse brain: further evidence for phencyclidine/sigma opiate receptor commonality., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 237, 681-688.

- Snyder, S.H. (1980). Phencyclidine., *Nature*, 285, 355-356.
- Soderling, T.R., Tan, S.E., McGlade-McCulloh, E., Yamamoto, H. & Fukunaga, K. (1994). Excitatory interactions between glutamate receptors and protein kinases., *Journal of Neurobiology*, 25, 304-311.
- Sonders, M.S., Keana, J.F.W. & Weber, E. (1988). Phencyclidine and psychotomimetic sigma opiates: recent insights into their biochemical and physiological sites of action., *Trends in Neurosciences*, 11, 37-40.
- Su, T.-P. (1991). σ receptors — putative links between nervous, endocrine, and immune systems., *European Journal of Biochemistry*, 200, 341-345.
- Taylor, D.P. & Dekleva, J. (1987). Potential antipsychotic BMY14802 selectively binds to sigma sites., *Drugs Developmental Research*, 11, 65-70.
- Traynelis, S.F. & Cull-Candy, S.G. (1991). Pharmacological properties and H^+ sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones., *Journal of Physiology (London)*, 443, 727-763.
- Vaupel, D.B. (1983). Naltrexone fails to antagonize the effects of PCP and SKF 10047 in the dog., *European Journal of Pharmacology*, 139, 125-128.
- Walker, J.M., Bowen, W.D., Walker, F.O., Matsumoto, R.R., de Costa, B.R. & Rice, K.C. (1990). Sigma receptors: biology and function., *Pharmacological Reviews*, 42, 355-402.
- Walker, L., Matsumoto, R., Bowen, W., Gans, D., Jones, K. & Walker, F. (1988). Evidence for a role of haloperidol-sensitive sigma-opiate receptors in the motor effects of antipsychotic drugs., *Neurology*, 38, 961-965.

- Weissman, A.D., Casanova, M.F., Kleinman, J.E., London, E.D. & De Souza, E.B. (1991). Selective loss of cerebral cortical sigma, but not PCP binding sites in schizophrenia., *Biological Psychiatry*, 29, 41-54.
- Weissman, A.D., Broussolle, E.P. & London, E.D. (1990). *In vivo* binding of [³H]*d*-N-allylnormetazocine and [³H]haloperidol to sigma receptors in the mouse brain., *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 3, 347-354.
- Wong, E.H.F., Knight, A.R. & Woodruff G.N. (1988). [³H]MK-801 labels a site on the *N*-Methyl-D-Aspartate receptor channel complex in rat brain membranes., *Journal of Neurochemistry*, 50, 274-281.
- Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Sagi, N., Klenerová, V., Goji, K., Kawai, N., Baba, A., Takamori, E. & Moroji, T. (1995). Sigma ligands indirectly modulate the NMDA receptor-ion channel complex on intact neuronal cells via σ 1 site., *The Journal of Neuroscience*, 15, 731-736.
- Zukin, R & Zukin, S. (1988). In the opiate receptors, In Pasternak, G. (Éds), *The σ receptor* (pp 143-163), New Jersey: Humance Press.

APPENDICE A

Caractéristiques des agents pharmacologiques

On utilise plusieurs compétiteurs pendant ce protocole. Les structures moléculaires de ces compétiteurs sont présentées à partir de la page 95. Voici la liste de leurs caractéristiques pharmacologiques :

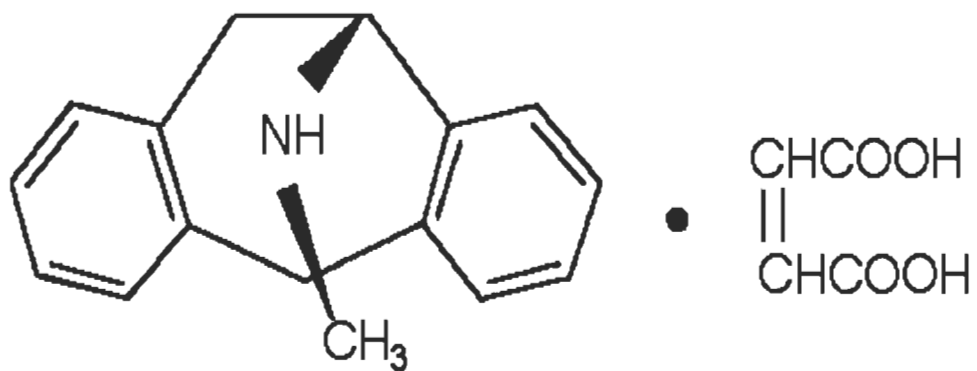
- La dizocilpine (MK-801) qui agit à l'intérieur du canal ionique du récepteur NMDA est un antagoniste non compétitif hautement puissant et sélectif du récepteur NMDA. Elle partage son site de liaison avec le PCP, la kétamine et d'autres agents qui provoquent une anesthésie dissociée (a).
- Le 1,3-di(2-tolyl)-guanidine (DTG), un dérivé de la guanidine, se lie de façon réversible et sélective aux sites sigma. Le site sigma est peut-être responsable des effets psychotomimétiques de la phencyclidine (PCP) et de certains opiacés de type benzomorphone, comme par exemple le N-allylnormetazocine (SKF-10047). Les sites sigma peuvent jouer un rôle

comme site d'action pour ces drogues psychoactives et dans certaines maladies, surtout la schizophrénie (b).

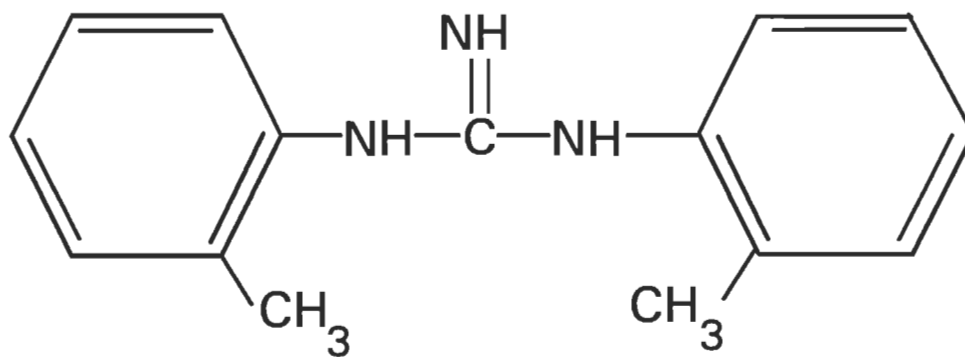
- L'halopéridol est un antagoniste dopaminergique qui reconnaît mieux les récepteurs de type D_2 que D_3 . C'est un neuroleptique typique qui appartient au groupe des butyrophénones et qui provoque des effets extrapyramidaux indésirables. C'est aussi un des meilleurs ligands pour le site sigma (c).
- La kétamine est un antagoniste non compétitif puissant et sélectif du récepteur NMDA. Son site d'action se situe à l'intérieur du canal ionique du complexe récepteur NMDA. Elle a un site d'action qui est partagé par le PCP, le MK-801 et d'autres agents qui provoquent une anesthésie dissociée (d).
- Le (+)-N-allylnormetazocine ou (+)-NANM (SKF-10047) est un agoniste des sites sigma. Ce fut la première substance utilisée pour caractériser les sites sigma. Le SKF-10047 est un opiacé de type benzomorphone ayant des propriétés mixtes d'agoniste et d'antagoniste, il a un pouvoir analgésiant (e).

- Le 5- (aminosulfonyl)- N- [(1- ethyl -2- prolidynyl) methyl]-2- methoxybenzamide (sulpiride) est un antagoniste dopaminergique, qui reconnaît mieux D_3 que D_2 , et un neuroleptique typique qui cause des symptômes extrapyramidaux : syndrome parkinsonien et dyskinésies (f).

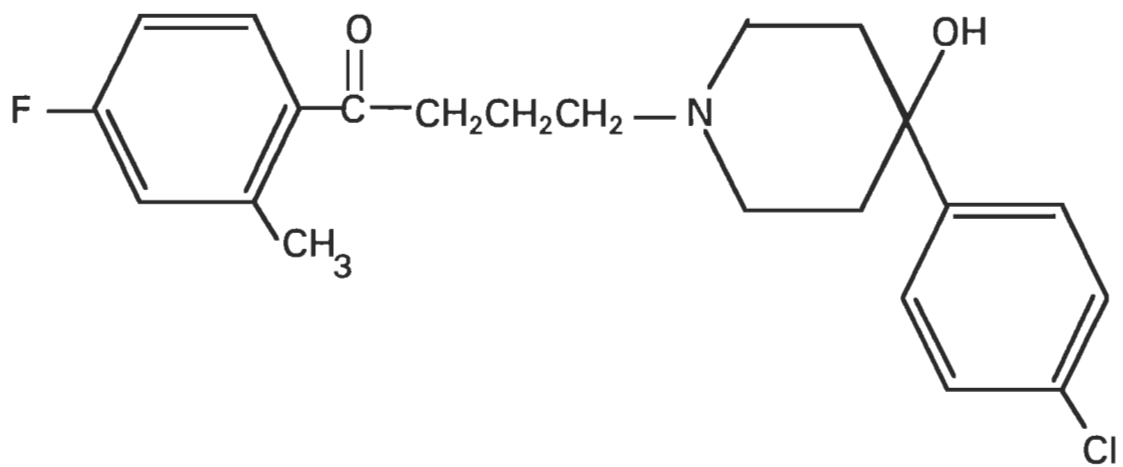
Représentation des structures moléculaires des compétiteurs



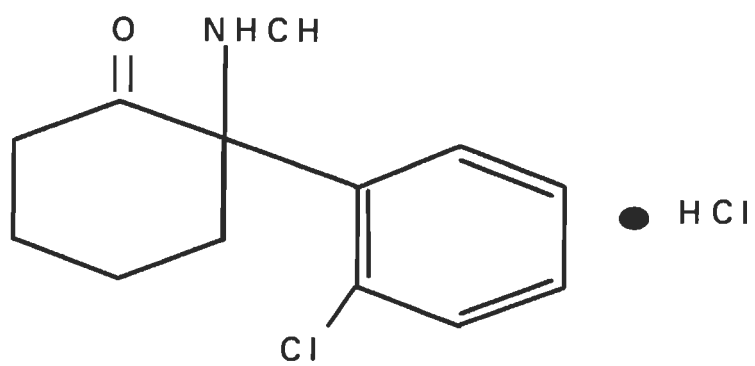
a.



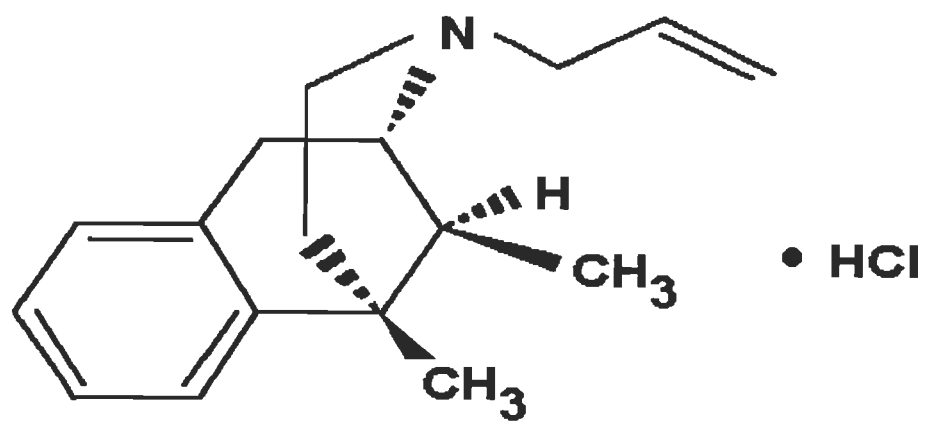
b.



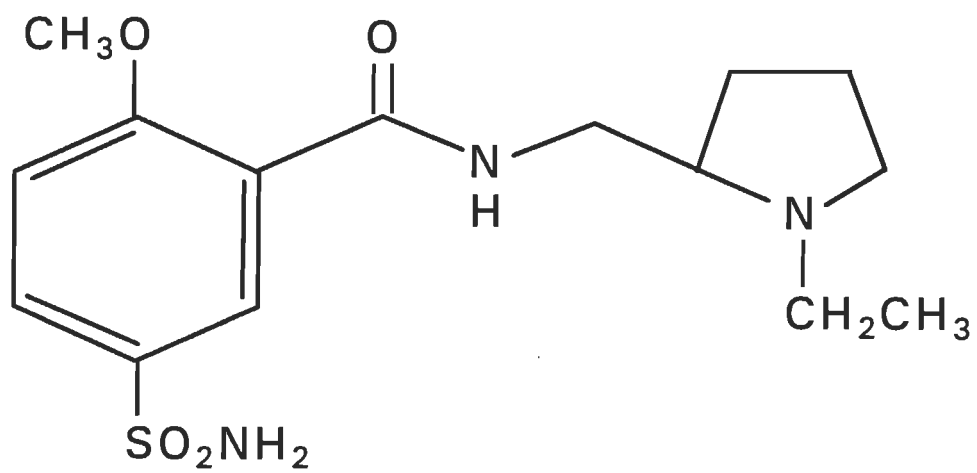
c.



d.



e.



f.